

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES QUIRÚRGICAS,
BIOQUÍMICA E INMUNOLOGÍA**

**ANÁLISIS GENÉTICO DEL DIMORFISMO SEXUAL EN
EL EJE DE FOLATOS-HOMOCISTEÍNA EN UNA
POBLACIÓN TRATADA CON ÁCIDO FÓLICO**

ANA MARÍA LENDÍNEZ RAMÍREZ

Málaga, 2015


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Ana María Lendínez Ramírez

 <http://orcid.org/0000-0003-3644-6736>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Departamento de Especialidades Quirúrgicas,
Bioquímica e Inmunología
FACULTAD DE MEDICINA

D. ARMANDO REYES ENGEL

Prof Titular de Bioquímica y Biología Molecular

D. MAXIMILIANO RUIZ GALDÓN

Prof Titular de Bioquímica y Biología Molecular

CERTIFICAN

que la Tesis Doctoral que presenta D^a Ana M^a Lendínez Ramírez, Licenciada en Farmacia, ha sido realizada bajo su dirección, con el título “Análisis genético del dimorfismo sexual en el eje de folatos-homocisteína en una población tratada con ácido fólico” para su lectura y defensa ante el Tribunal designado por la Comisión de Doctorado de la Universidad de Málaga. Una vez redactado el presente trabajo, ha sido revisado encontrándose conforme para ser defendido y aspirar al grado de Doctor. Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, se expide el presente certificado.

Lo que se firma en Málaga en Noviembre de 2015

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Fdo: Armado Reyes Engel

Maximiliano Ruiz Galdón

A mi familia

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Al departamento de Departamento de Especialidades Quirúrgicas, Bioquímica e Inmunología por abrirme las puertas a la investigación y permitirme realizar esta tesis doctoral en sus instalaciones.

Al profesor Armando Reyes Engel por ser el impulsor y artífice de este proyecto, por su tutela y todas las enseñanzas que me ha brindado. Por confiar siempre en mi capacidad y animarme a no decaer. Gracias a sus críticas, siempre constructivas, que me han hecho crecer y aprender que sólo hay que proponérselo y trabajar para conseguir algo en ciencia.

Al profesor Maximiliano Ruiz Galdón, la primera persona que conocí en un laboratorio. Es para mí un ejemplo a seguir como profesional en el Laboratorio Clínico, como docente e investigador. Gracias por su apoyo y por darme la oportunidad de unirme a su grupo de trabajo.

A mis compañeros doctorandos Arturo Reyes Palomares y Beatriz Pérez Nevot, por todas las experiencias que hemos compartido, dentro y fuera del laboratorio. Por haber empezado juntos esta andadura, son las personas que mejor pueden entender lo vivido en cada etapa.

A Irene González por su colaboración incondicional y desinteresada en todo aquello que he necesitado, no sólo como técnico de laboratorio sino también como compañera cercana que nunca cesó de decirme que no me perdiera y así he llegado al final.

Gracias a mis compañeros analistas del Hospital Costa del Sol. A Marisa Hortas por darme el empujón necesario para finalizar el trabajo empezado y marcarme la meta. A Eva Martín y Gonzalo Callejón por sus compartir conmigo sus experiencias, por

sus consejos y por los ánimos diarios que durante meses me han dado. A Miguel Cantero por su empatía y gran ayuda en los trámites de presentación de esta tesis.

A mis padres por inculcarme el sentido de la responsabilidad, por darme la oportunidad de dedicarme siempre a lo que me ha gustado. A ellos les debo todo lo que soy.

Por último pero más especial e importante, quiero dar las gracias a la persona que día a día ha estado a mi lado, mi marido, Francisco Vázquez Medina. Sin su apoyo incondicional, dedicación y sacrificio nunca hubiera podido conseguirlo. Gracias, Neno.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- ***Sexual dimorphism in folate metabolism.*** Presentada como comunicación escrita en el *21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine-19th IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine-8th Annual Meeting of the German Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* Berlín, Mayo 2011. Clin Chem Lab Med 2011; 49, S1:S874

ARTÍCULOS

- Lendinez AM, Palomares AR, Perez-Nevot B, Cortés Rodríguez M, Ruiz-Galdón M, Reyes-Engel A. ***Differential Behavior of Serum and Red Blood Cell Folate During a Treatment with Levofolinic Acid. Gender Differences.*** Clin. Lab. 2014;60:1579-1584



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ABREVIATURAS

A: Adenina

ATP: Adenosil trifosfato

ADN/DNA: Ácido desoxirribonucleico

ARN/RNA: Ácido ribonucleico

B₆: Vitamina B6

B₁₂: Vitamina B12, cobalamina

CBS: cistationinaßsintasa

C: Citosina

Cys: Cisteína

BHMT: Betaína-Homocisteína-metiltransferasa

DHF: dihidrofolato

DHFR: dihidrofolato-reductasa

DNA: ácido desoxirribonucleico

DTN: defectos del tubo neural

dTMP: desoxitimidilato

DTN: Defectos de cierre del tubo neural

dUMP:: desoxiuridilato

EA: enfermedad de Alzheimer

ECV: enfermedad cardiovascular

EDF: equivalentes dietarios de folato

ESR1: Receptor de estrógenos 1 alfa

FR: factor de riesgo

G: Guanina

Hcy: Homocisteína

LCR: Líquido cefalorraquídeo

Met: metionina

MTHFD1: Metilentetrahidrofolato-deshidrogenasa1

MTHFR : Metilen-tetrahidro-folato reductasa

MTR: 5-metil-tetrahidrofolato - homocisteína S-metiltransferasa ó Metionina sintetasa

MTRR: MTR reductasa

NAD: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido

NADH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido reducido

NADP: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato

NADPH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato reducido

PABA: ácido paraaminobenzoico

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PteGlu: ácido pteroilglutámico

SAM: S-adenosilmetionina

SAH: S-adenosilhomocisteína

Ser: Serina

SHMT: serina hidroximetiltransferasa

SNC: Sistema nervioso central

SNP: *Singe Nucleotide polymorphism*, polimorfismo de un solo nucleótido

TEA: Trastorno del espectro autista

TCN: transcobalamina

THF: Tetrahidrofolato

T: Timina

TYMS: timidilato-sintasa

RFC1: Transportador de folatos reducido, en inglés *Reduced Folate Carrier*



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1. FOLATOS	3
1.1.1. Formas químicas de folatos	3
1.1.1.1. Folatos naturales	4
1.1.1.2. Interconversión de folatos	5
1.1.2. Fisiología del folato en el organismo	8
1.1.2.1. Absorción	8
1.1.2.2. Distribución	8
1.1.2.3. Eliminación	9
1.1.2.4. Funciones bioquímicas y actividad biológica	9
1.1.3. Déficit de folato	11
1.1.3.1. Alteraciones hematológicas: Anemia megaloblástica	12
1.1.3.2. Alteraciones del Sistema Nervioso Central	12
➤ Defectos del tubo neural	13
➤ Enfermedad de Alzheimer y demencia senil	14
➤ Otros desórdenes del SNC	14
1.1.3.3. Déficit de folato y aborto	15
1.1.4. Necesidades y recomendaciones dietéticas para folatos	16
1.1.5. La controversia del exceso de ácido fólico	17
1.1.5.1. Efectos adversos en SNC relacionado con el déficit de vitamina B ₁₂	18
1.1.5.2. Epilepsia y exceso de ácido fólico	19
1.1.5.3. Cáncer	19
1.1.5.4. Eficacia de las terapias “antifolato”	20
1.1.5.5. Influencia de la elevación materna en tejido adiposo e insulina	20
1.1.5.6. Incremento de los embarazos gemelares	21
1.1.5.7. Selección genética	21
1.1.5.8. Trastorno del Espectro autista	21
1.2. HOMOCISTEÍNA	22
1.2.1. Estructura química	22
1.2.2. Metabolismo de la Homocisteína	23
1.2.2.1. Integración del metabolismo de la homocisteína	28
1.2.3. Implicaciones clínicas de las alteraciones en el metabolismo de la Hcy	30
1.2.3.1. Homocistinurias	30
1.2.3.2. Hiperhomocisteinemia	32
➤ Causas genéticas	32
➤ Causas adquiridas	33



➤ Otros factores	34
1.2.3.3. La homocisteína como factor de riesgo cardiovascular	35
➤ Mecanismos patogénicos	37
1.2.4. Valores de referencia	38
1.3. TRATAMIENTOS CON FOLATOS	40
1.3.1. Formas de administración de folatos: folatos sintéticos	40
1.3.2. Fortificación alimentaria con ácido fólico	42
1.3.3. Evaluación del tratamiento con folatos	43
1.4. DIMORFISMO SEXUAL	45
1.4.1. Dimorfismo sexual en el metabolismo de los folatos-Hcy	46
1.4.2. Dimorfismo sexual en polimorfismos genéticos	48
1.5. POLIMORFISMOS GENÉTICOS RELACIONADOS CON EL TRANSPORTE, METABOLISMO DE LOS FOLATOS Y CICLO DE LOS METILOS	49
1.6. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS	50
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
2.1. HIPÓTESIS	59
2.2. OBJETIVOS	59
3. MATERIAL Y MÉTODOS	61
3.1. SUJETOS DE ESTUDIO	63
3.1.1. Criterios de exclusión	63
3.1.2. Criterios de inclusión	63
3.2. TRATAMIENTO	63
3.3. TOMA DE MUESTRAS	64
3.4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	64
3.4.1. Determinación de Homocisteína plasmática	64
3.4.2. Determinación de Vitamina B ₁₂ y Folatos	65
3.5. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS	65
3.5.1. SNPs	66
3.5.2. Otros polimorfismos	72
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	73
3.6.1. Estudio de las variables bioquímicas	73
3.6.2. Análisis estadístico de los genotipos	74
3.6.3. Análisis estadístico de los parámetros bioquímicos durante el tratamiento según genotipo y sexo	76
3.6.4. Análisis de asociación entre haplotipos del ESR1 de los parámetros bioquímicos durante el tratamiento	77
3.6.5. Análisis de asociación del número de mutaciones de los SNPs de la MTHFR y los parámetros bioquímicos	77

4. RESULTADOS	79
4.1. FOLATO INTRAERITROCITARIO	81
4.1.1. Estadística descriptiva de niveles de folato intraeritrocitario	81
4.1.2. Estadística inferencial de folato intraeritrocitario	81
4.2. FOLATO SÉRICO	83
4.2.1. Estadística descriptiva de niveles de folato sérico	83
4.2.2. Estadística inferencial de folato sérico	83
4.3. HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA	85
4.3.1. Estadística descriptiva de niveles de homocisteína plasmática	85
4.3.2. Estadística inferencial de homocisteína plasmática	86
4.4. VITAMINA B ₁₂ SÉRICA	87
4.5. EVOLUCIÓN DE LOS DATOS BIOQUÍMICOS EN AMBOS SEXOS	88
4.5.1. Correlación de los niveles de Hcy y folatos	89
4.5.2. Ratios Folatos/Hcy	90
4.6. ANÁLISIS POBLACIONAL DE LOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS	92
4.7. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS SEGÚN EL GENOTIPO	94
4.7.1. ATIC (rs2372536, c.347C>G)	94
4.7.2. BMHT (rs3733890, c.716G>A)	96
4.7.3. ESR1	98
4.7.3.1. ESR1 rs2234693 (Pvull, c.453-397 T>C)	98
4.7.3.2. ESR1 rs9340799 (Xbal, c.453-351 A>G)	100
4.7.3.3. Análisis de los haplotipos	102
4.7.4. MTHFD1 rs2236225 (c. 1958G>A)	105
4.7.5. MTHFR	107
4.7.5.1. rs1801131 (1298 A>C)	107
4.7.5.2. rs1801133 (677C>T)	109
4.7.5.3. Estudio de Haplotipos y genotipos dobles del rs1801133 (677C>T) y rs1801131 (1298 A>C)	111
4.7.5.4. Comparación de los parámetros bioquímicos en función del número de mutaciones	114
4.7.6. MTRR rs1801394 (c.66A>G)	118
4.7.7. RFC1 rs1051266 (c.80A>G)	120
4.7.8. TCN2 rs1801198 (c.776C>G)	122
4.7.9. TYMS rs2853542 (C>G, 28bp VNTR 3R)	123
5. DISCUSIÓN	127
5.1. Sobre el grupo de estudio	130
5.2. Sobre el tratamiento	130
5.3. Influencia del tratamiento en los niveles sérico e intraeritrocitario de folato	130
5.3.1. Población de estudio	131



5.3.2. Influencia del sexo	132
5.3.3. Efecto de los polimorfismos genéticos en los niveles de folatos	135
5.3.3.1. ATIC rs2372536 (c.347C>G)	135
5.3.3.2. ESR1: rs9340799 y rs2234693	135
5.3.3.3. MTHFD1 rs2236225 (c.1958G>A)	139
5.3.3.4. MTHFR	139
➤ rs1801131 (A1298C)	140
➤ rs1801133 (677C>T)	141
5.3.3.5. MTRR rs1801394 c.66A>G	143
5.3.3.6. RFC1 rs1051266, c.80A>G	143
5.3.3.7. TCN2776 rs1801198, c.776G>A	146
5.3.3.8. TYMS rs2853542 (C>G, 28bp VNTR 3R)	147
5.4. Influencia del tratamiento en los niveles de homocisteína	148
5.4.1. Población de estudio	148
5.4.2. Influencia del sexo	149
5.4.3. Contribución de los folatos al descenso de Hcy	151
5.4.4. Influencia de los polimorfismos genéticos en Hcy	153
5.4.4.1. BMHT rs3733890 (c.716G>A)	153
6. CONCLUSIONES	155
7. BIBLIOGRAFÍA	159



1. INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1.1. FOLATOS

Bajo el término folatos se agrupan los derivados del ácido fólico, una familia de vitaminas con actividad biológica equivalente que intervienen como cosustratos en las reacciones que movilizan unidades monocarbonadas en diferentes estados de óxido-reducción.

1.1.1. Formas químicas de folatos

Los folatos tienen en común la estructura química del ácido pteroilglutámico (PteGlu) formada por una molécula de ácido pteroico conjugado por un enlace tipo amida con una o más unidades de ácido glutámico. El ácido pteroico a su vez está formado por un anillo de pteridina unido por un puente metileno al ácido paraaminobenzoico (PABA). El ácido glutámico unido mediante un enlace peptídico al extremo carboxilo del PABA constituye la molécula de ácido fólico (Figura 1).

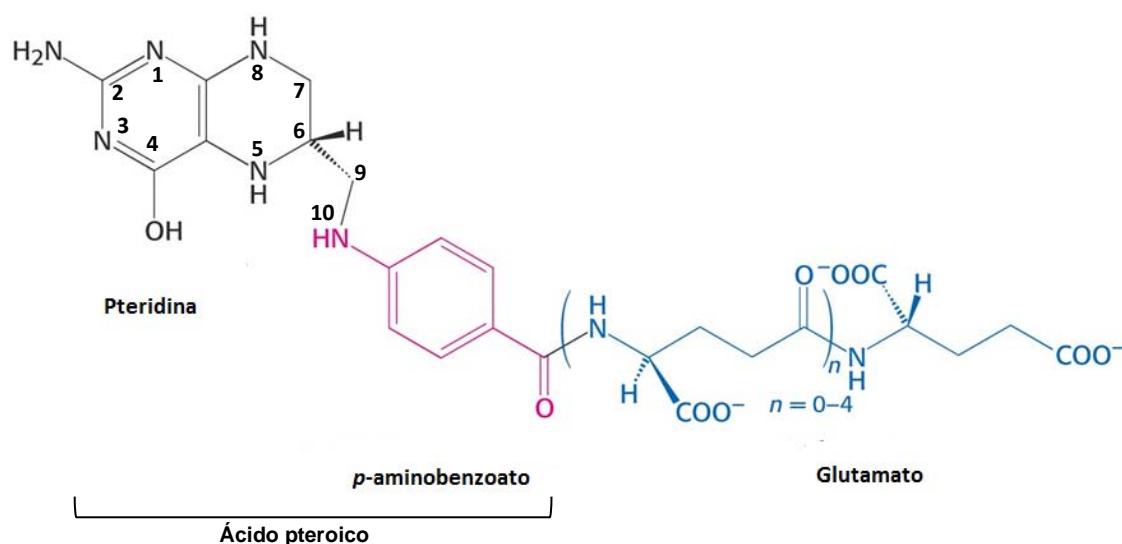


Figura 1: Estructura del Tetrahydrofolato.

El anillo de pteridina puede estar parcialmente reducido en las posiciones 7 y 8 como dihidrofolato (DHF, H₂PteGlu) o completamente reducido en 5, 6,7 y 8 como

tetrahidrofolato (THF, H₄PteGlu). El THF (Figura1) a su vez es aceptor de unidades monocarbonadas en posiciones 5 y 10 o ambas y con diferentes estados de oxidación (Tabla 1). La forma más reducida de THF transporta un grupo metilo en su nitrógeno en posición 5 (N⁵) y la forma más oxidada transporta un grupo formilo (-CHO-); las formas intermedias transportan metileno, formilo y formimino.

Nombre	Estructura	Abreviatura
Ácido fólico, pteroilglutámico		PteGlu
Dihidrofolato	-H en 5 y 6	DHF, H ₂ PteGlu
Tetrahidrofolato	-H en 5, 6,7 y 8	THF, H ₄ PteGlu
5-formil-tetrahidrofolato (folínico)	- CHO- en 5	5-formilTHF
10-formil-tetrahidrofolato	- CHO- en 10	10-formilTHF
5-formimino-tetrahidrofolato	- CH=NH- en 5	5-formiminoTHF
5, 10-metenil-tetrahidrofolato	- CH = en 5 y 10	5, 10-metenilTHF
5-metil-tetrahidrofolato	- CH ₃ en 5	5-metilTHF
5, 10-metilen-tetrahidrofolato	- CH ₂ - en 5,10	5, 10-metilenTHF

Tabla 1: Formas de folato

Todos los folatos pueden presentar un número variable de glutámicos unidos a la estructura formando mono- y poliglutamatos (hasta 7 residuos) (Blakley, 1987).

1.1.1.1. Folatos naturales

Los folatos forman parte de las vitaminas hidrosolubles del grupo B. Las células animales no son capaces de sintetizar PABA ni de fijar el primer residuo de ácido glutámico al ácido pterico, por ello deben ser aportadas a través de la dieta. En la naturaleza, los sintetizan plantas y bacterias. Están presentes en una gran variedad de vegetales, sobre todo de hoja verde. La creencia de que estaban presentes grandes cantidades en las hojas verdes fue lo que dio nombre a estas vitaminas del latín *folium*, hoja. Están también presentes en frutas, cereales, legumbres, levaduras y frutos secos.

Es abundante en hígado de animales, como consecuencia de la transferencia de folatos en la cadena trófica.

En los alimentos se encuentran en forma de mono- y poliglutamatos (a partir de dos restos de glutámico), siendo de mayor la biodisponibilidad los monoglutamatos (González-Gross et al., 2002). Alrededor del 90% de los folatos alimentarios se encuentran en forma de poliglutamatos. Son inestables por lo que durante su almacenamiento y en la preparación tienden a oxidarse y a la reconjugación a monoglutamatos.

1.1.1.2. Interconversión de folatos

En los folatos naturales el anillo de pteridina puede presentar diferente grado de hidrogenación. La forma de folato activa desde el punto de vista biológico es el THF.

La clave de su actividad está en la capacidad de interconversión de las diferentes formas de folato en función del estado de óxido reducción de las unidades monocarbonadas del N⁵ de la pteridina y del N¹⁰ del PABA (Figura 1). La versatilidad del THF hace que se puedan interconvertir las unidades monocarbonadas entre sí por medio de las reacciones reversibles catalizadas por la enzima trifuncional Metilentetrahydrofolato-deshidrogenasa-NAD-dependiente (MTHFD1). Además de actividad deshidrogenasa es una ciclohidrolasa y sintetasa de formilTHF. Mediante la MTHFD1 es posible la formación de:

- 10 formilTHF, a partir del THF, formiato y ATP.
- 5,10-metenilTHF, a partir de 10-FormilTHF con la incorporación de una molécula de agua.
- 5,10-metilenTHF por reducción de 5,10-metenilTHF con NADH como coenzima.

El 5,10-metilenTHF se reduce de manera irreversible a 5-metilTHF por medio de la metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR), flavoproteína citoplasmática compuesta

de un homodímero (Goyette et al., 1994). Participa el NADPH como coenzima dador de electrones. Esta enzima es clave en el metabolismo de los folatos ya que una actividad reducida de la misma disminuye la formación de 5-metilTHF y condiciona el funcionamiento del ciclo de los metilos como se explica más adelante.

Las reacciones de interconversión de folatos se ilustran en la figura 2 junto con el resto de reacciones en las que están implicados los folatos que se describen al completo en el apartado de funciones bioquímicas y actividad biológica de los folatos.

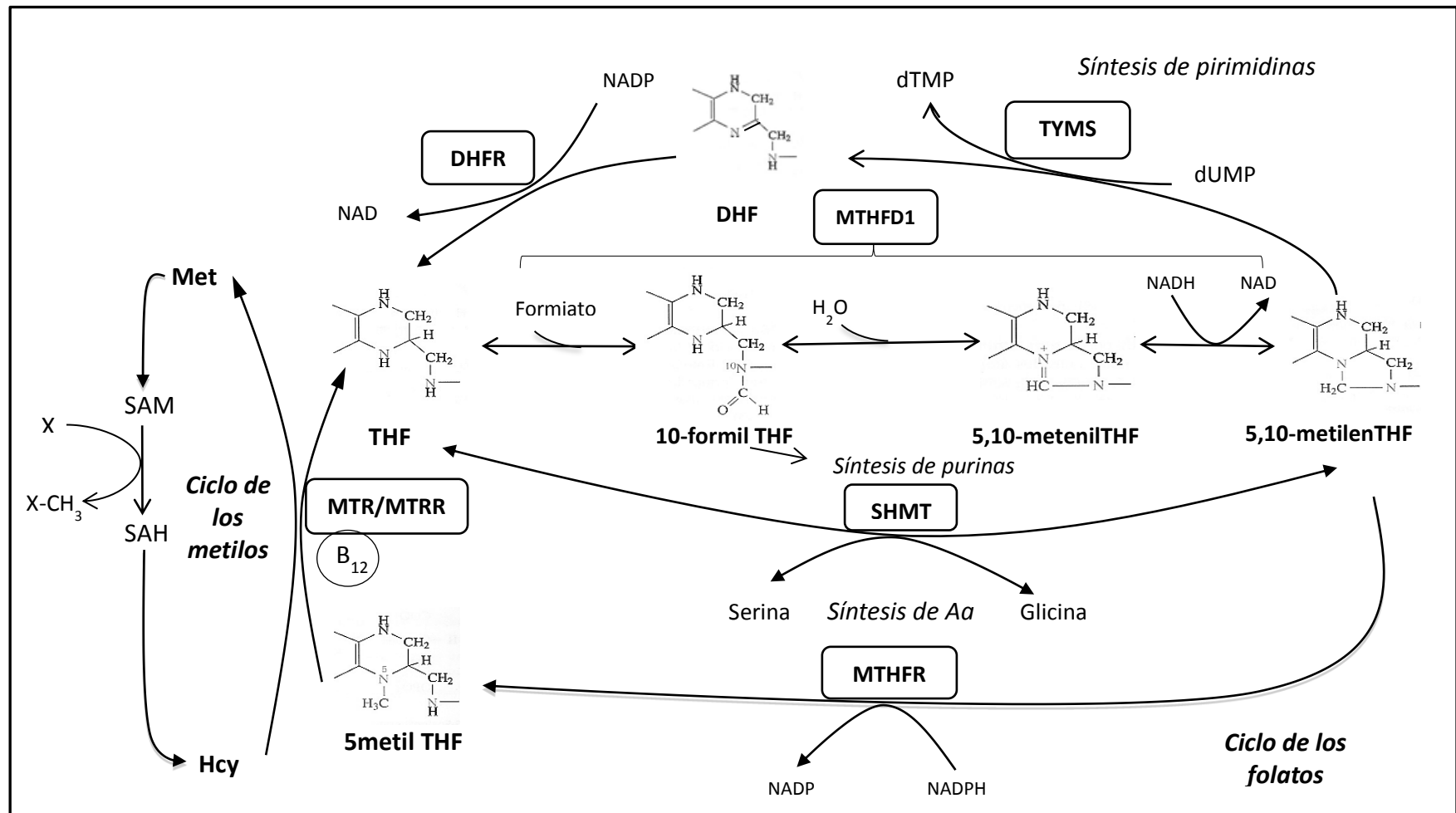


Figura2: Conversiones de los fragmentos monocarbonados unidos al THF

Aa: aminoácidos; B₁₂: vitamina B₁₂ o cianocobalamina; DHF: dihidrofolato; DHFR: dihidrofolatorreductasa; dTMP: desoxitimidilato-monofosfato; dUMP: desoxiuridina monofosfato; Hcy: Homocisteína; Met: Metionina; MTHFD1: Metilentetrahidrofolato-deshidrogenasa-ciclohidrolasa-formiltetrahidrofolato-sintetasa; MTHFR: metilentetrahidrofolatoreductasa; MTR: metionina-reductasa; NAD: nicotinamida adenina dinucleótido; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; SMHT: Serina-hidroximetil transferasa; THF: tetrahidrofolato; TYMS: timidilato sintetasa; X: sustrato; X-CH₃: sustrato metilado

1.1.2. Fisiología del folato en el organismo

1.1.2.1. Absorción

Los folatos de la dieta se encuentran como poliglutamatos unidos a proteínas. En el intestino por acción de las proteasas digestivas se liberan de las proteínas alimentarias. El paso previo a la absorción intestinal es la hidrólisis de poliglutamatos a monoglutamatos por medio de una conjugasa: la γ glutamil-carboxipeptidasa. A nivel del yeyuno proximal y por un transporte activo pH dependiente, los monoglutamatos pasan a través de las células de la mucosa intestinal. Este proceso sigue una cinética de saturación que es estimulada por la presencia de glucosa y sodio con las que se absorbe mediante co-transporte. En torno al 20-30% del folato se absorbe mediante difusión pasiva (mecanismo no saturable). Este último mecanismo es por el que se absorben los folatos sintéticos administrados a altas dosis. Los folatos que ingresan en la célula intestinal son transferidos al plasma sin sufrir transformaciones salvo una pequeña parte que es reducido y metilado para dar lugar a 5-metilTHF.

1.1.2.2. Distribución

En sangre, los folatos se dirigen al hígado donde los monoglutamatos son reducidos y metilados a 5-metilTHF, el cual regresa a la circulación donde llegará a todos los tejidos. En el hígado también se conjugan a poliglutamatos que bien se almacenan intracelularmente o pasan a THF. La homeostasis del folato es regulada por un ciclo enterohepático importante: parte de los folatos secretados en la bilis son de nuevo reabsorbidos y de esta forma las reservas hepáticas de folato cubren las necesidades para unos cuatro meses. El 5-metilTHF circula unido a proteínas, sobre todo albúmina y a una proteína de alta afinidad por los folatos, “proteína ligante de folatos”. El contenido de folatos en el organismo se encuentra entre 5 y 10 mg. Los órganos más ricos en folato son el hígado y el cerebro. La concentración intraeritrocitaria es de 10 a 30 veces mayor que la plasmática y en líquido

cefalorraquídeo (LCR) la tasa de folatos es unas 3 o 4 veces superior a la tasa plasmática.

1.1.2.3. Eliminación

Las vías de eliminación de folato son la fecal y urinaria. En heces se elimina la fracción de folatos alimentarios que no se absorben, de la secreción biliar y una fracción sintetizada por bacterias intestinales (que también se absorbe y contribuye en pequeña proporción al estatus corporal de folatos). Los productos resultantes del metabolismo de folatos como pteridinas y ácido benzoilglutámico se eliminan por la orina. Parte de los folatos filtrados son también reabsorbidos en los túbulos renales (Varela Moreiras, G. y Alonso Aperte, E., 2005).

1.1.2.4. Funciones bioquímicas y actividad biológica

La capacidad de transporte de grupos monocarbonados activos en su estructura confiere a los folatos crucial importancia para el organismo como son las reacciones de metilación a través del ciclo de los metilos, la síntesis de pirimidinas (desoxitimidilato, dTMP), de aminoácidos y de purinas (síntesis *de novo*). Las reacciones que tienen lugar están representadas en la figura 2 y se describen a continuación.

- Reacciones de metilación. Ciclo de los metilos

Los folatos no participan directamente en las reacciones de metilación ya que su potencial de transferencia no es suficientemente elevado para las reacciones que requieren la cesión de unidades de carbono altamente reducidas como el grupo metilo. En su lugar el dador de metilos es la S-adenosilmetionina (SAM), sintetizada mediante la transferencia del grupo adenosilo del ATP al átomo de azufre de la metionina (Met). El grupo metilo de la Met resulta así activado por efecto de la carga positiva del átomo de azufre adyacente, lo cual lo hace mucho más reactivo que el 5-

metilTHF (Stryer et al., 2003). La transferencia del grupo metilo de la SAM a las diversas reacciones biosintéticas que requieren metilos (metilación del DNA, síntesis de catecolaminas, etc.) genera Hcy. Para regenerar la Met gastada, el 5-metilTHF le transfiere a la Hcy su grupo metilo. Esta transferencia está catalizada por la Metionina sintetasa (MTR) que usa como coenzima la metilcobalamina, derivado de la vitamina B₁₂. Estas reacciones constituyen el ciclo de los metilos activados (Figura 2). A su vez la acción de la MTR está regulada por la MTR reductasa (MTRR) que reduce el cofactor de la MTR (B₁₂, cobalamina II a cobalamina I,) para que la MTR sea funcional.

Aunque el dador de grupos metilos es la SAM, para el correcto funcionamiento de este ciclo es imprescindible el concurso de los folatos, particularmente del 5-metilTHF, por lo que se puede decir que, en última instancia, los folatos son los verdaderos donadores de unidades monocarbonadas, incluidas sus formas más reducidas. El 5,10-metilenTHF se reduce de manera irreversible a 5-metilTHF gracias a la MTHFR, siendo la actividad de esta enzima clave para el adecuado funcionamiento del ciclo.

- Síntesis de pirimidinas

Proceso de extraordinaria importancia en la duplicación y reparación del ácido desoxirribonucleico (DNA). El grupo metilo del desoxitimidilato (dTMP) procede del 5,10-metilenTHF que por acción de la timidilato-sintasa (TYMS) transfiere el grupo metilo al desoxiuridilato (dUMP) y lo convierte así en dTMP. El 5,10-metilenTHF cede el fragmento monocarbonado y queda oxidado a dihidrofolato (DHF). El THF se regenera a partir del DHF mediante dihidrofolato reductasa (DHFR) que utiliza NADPH como agente reductor (Stryer et al., 2003).

- Síntesis de aminoácidos

El 5,10 metilen-THF interviene en la síntesis de glicina a partir de la serina (Ser) mediante la reacción reversible catalizada por la glicina/Ser hidroximetiltransferasa (SMHT), captando el THF el grupo alcohólico transformándose en 5,10 metilen-THF.

Esta reacción es importante ya que el carbono que cede la Ser al THF puede dirigir el grupo metilo hacia el ciclo de los metilos o hacia la síntesis de pirimidinas y de purinas mediante la interconversión a otras formas de folatos (Tapia, 2004).

- Síntesis de novo de purinas

Aunque en el individuo adulto la síntesis de purinas se realiza mayoritariamente por la vía de la recuperación, la síntesis “de novo” es importante en los períodos de desarrollo y en las estirpes celulares de alta tasa de crecimiento. El 10-formilTHF incorpora unidades monocarbonadas en dos reacciones del proceso (Stryer et al., 2003).

Tal como se observa en la figura 2, el 5,10-metilenTHF juega un papel clave en las interconversiones de folatos; a partir de él se puede llegar a cualquier forma de folato, y la mayoría de los folatos deben pasar por él para recuperar el THF. Por tanto, la inhibición o estimulación de una de las vías de utilización del 5,10-metilenTHF, traerá consecuencias sobre las otras vías. Por ejemplo, una actividad enzimática disminuida de la MTHFR, producirá una menor cantidad de 5metil-THF, comprometiéndose el ciclo de los metilos, con aumento de la Hcy. El 5,10-metilenTHF que no puede ser utilizado por esta vía, se redirigirá hacia la síntesis de dTMP, viéndose aumentada la eficacia metabólica de la síntesis y reparación de DNA.

1.1.3. Déficit de folato

La deficiencia de folato es de los déficits vitamínicos más frecuentes. Puede deberse a un aporte inadecuado, un problema en su absorción, a un aumento de las necesidades, a trastornos genéticos o a interacciones farmacológicas que afectan al metabolismo de los folatos.

Las consecuencias del déficit de folato se pueden agrupar en dos: las hematológicas y las que afectan al sistema nervioso central (SNC). Por otro lado, el déficit de folato se ha asociado como causa de aborto asociado hiperhomocisteinemias moderadas.

1.1.3.1. Alteraciones hematológicas: Anemia megaloblástica

La patología que se desarrolla en una deficiencia mantenida de folato es la anemia megaloblástica. Se manifiesta al cabo de 4 o 5 meses de déficit que da lugar a un fallo en la maduración de los precursores hematopoyéticos de la médula ósea. Se ven afectadas las tres series medulares y origina cambios morfológicos denominados megaloblásticos siendo más evidentes en la serie roja. La síntesis inadecuada de DNA por la carencia de dTMP (reacción catalizada por la TYMS que requiere 5,10-metilen THF, ver figura 2) hace que las células prolonguen su fase de síntesis, sean de mayor tamaño, y tarden más en abandonar la médula porque en definitiva lo que se produce es un asincronismo madurativo núcleo-citoplasma. En sangre periférica circulan hematíes de gran tamaño (de un volumen corpuscular medio >100fL) con tendencia a la hemólisis, menor vida media y formas inmaduras de la serie granulocítica (neutrófilos polisegmentados) (Anna Merino, 2005). La anemia megaloblástica sucede cuando existe un déficit de folato pero también de vitamina B₁₂ y en ocasiones es difícil distinguirlo clínicamente. De hecho la administración única de folatos en estos casos enmascara el deterioro neurológico en pacientes con déficit de B₁₂ que progresa hacia una desmielinización irreversible (Selhub et al., 2009).

1.1.3.2. Alteraciones del Sistema Nervioso Central

El paso de folato por la barrera hematoencefálica regula la homeostasis del folato en el SNC, que está presente en cerebro y LCR. En LCR la concentración de folato es de 2 a 3 veces superior a la del plasma. El THF participa en múltiples reacciones de metilación. A través de la SAM se produce la síntesis de colina y adrenalina entre otras

aminas biógenas. A partir de colina se sintetiza acetil colina, fosfolípidos y esfingomielina. Desde que se conoce que el folato es un cofactor esencial para el desarrollo del SNC, su déficit se ha asociado a diversos desórdenes neurológicos.

El deterioro cognitivo que se ha asociado a la deficiencia de folato puede ser por un mecanismo vascular o no vascular. La eliminación de Hcy por la vía de la transulfuración está inhibida a nivel cerebral por lo que su acumulación produce no sólo el efecto vascular propio de la Hcy (ver apartado 1.2.3.3) sino que además compite con los receptores de glutamato. La Hcy presenta una afinidad mucho mayor por estos receptores y una sobreexcitación de estos receptores tiene un efecto neurotóxico. Entre las afecciones del SNC debidas a un déficit de folato destacan:

➤ Defectos del tubo neural

El cierre del tubo neural se produce en los primeros 28 días de la gestación, incluso antes de que la mujer sepa que está embarazada. Este hecho toma relevancia si consideramos que aproximadamente la mitad de los embarazos no son planificados. El mayor factor de riesgo de defectos del tubo neural (DTN) es el estatus materno de folato entre otras causas genéticas, geográficas y socioeconómicas. El primer trabajo que sugirió la asociación del déficit de folato con complicaciones en el embarazo y trastornos congénitos se publicó en 1964 (Hibbard, 1964) y a partir de éste se han sucedido diversos estudios que han demostrado el papel del folato en prevenir el DTN (Smithells et al., 1980; Smithells et al., 1983). El mayor estudio que confirmó esta asociación fue un ensayo multicéntrico, aleatorio y doble ciego llevado a cabo por el *Vitamin Study Research Group* del *Medical Research Council*. Este grupo evidenció el efecto de suplementar los alimentos con ácido fólico reduciendo la incidencia de DTN del 3.5% al 1% en el grupo suplementado (*MRC Vitamin Study Research Group*, 1991). A partir de este hallazgo, en Estados Unidos se puso en marcha un programa estatal de suplementación de alimentos con folato que se ha implementado en otros países. El nivel de fortificación varía entre países pero en todos está orientado en reducir la prevalencia de DTN (Ray et al., 2002). Dado

el beneficio en reducción de los DTN y a la vista de los resultados publicados, en 2015 la Organización Mundial de la Salud ha elaborado una guía en la que recomienda tomar medidas de suplementación con folatos o de fortificación de alimentos con objeto de mantener la concentración de folato intraeritrocitario por encima de 906 nmol/L (400ng/mL) en mujeres en edad fértil (WHO, 2015).

➤ **Enfermedad de Alzheimer y demencia senil**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo caracterizado por el descenso cognitivo y la pérdida de memoria. Se trata de la forma más común de demencia. En los años 90 se publicaron los primeros trabajos que asociaban déficit de folato con EA. Numerosos estudios han aportado evidencias epidemiológicas a este respecto (Reay et al., 2013).

El déficit de folato puede alterar el desarrollo del DNA y los mecanismos de reparación neuronal. En la demencia senil y EA hay además un componente vascular en el que está implicada la Hcy y la disfunción endotelial que ésta genera. Se ha demostrado que la ingesta adecuada de folatos mejora la función cognitiva global (de Lau et al., 2007) y que los niveles crecientes de Hcy tiene un efecto en la reducción de la función cognitiva (Kim et al., 2007). Sobre los mecanismos que subyacen este déficit de folato aparte de los trastornos de absorción y dietéticos propios de la edad avanzada se ha discutido el efecto de variantes genéticas de las enzimas del ciclo de los folatos que exacerban el riesgo de EA y demencia: MTHFR C677T, RFC1 A80G, DHFR 19bpdel y la TCN2 G776C (Choi et al., 2014).

➤ **Otros desórdenes del SNC**

Se han asociado niveles bajos de folatos en gestantes a una alteración en el desarrollo de las células nerviosas del feto que resulta en retraso mental, espectro autista y otros trastornos del comportamiento (Bailey, 2009).

1.1.3.3. Déficit de folato y aborto

Thierchs, en 1952 sugirió por primera vez que los abortos espontáneos podrían estar relacionados con la deficiencia de folatos tras lograr la inducción de abortos terapéuticos con el 4-aminopteroilglutámico, antagonista del ácido fólico. Hibbard en 1964, y Martin en 1965, encuentran una asociación entre el aborto espontáneo habitual sin causa aparente y un déficit de folatos en la madre debido a una anomalía en el metabolismo de los folatos.

Más adelante, el grupo de Steegers-Theunissen observó que un 25% de las mujeres con abortos espontáneos de repetición o con un *abruptio placentae* tenían niveles altos de Hcy en sangre, tras descartar la existencia de una mutación en el gen de la cistationina- β -sintasa (CBS) (Steeegers-Theunissen et al., 1992). Estos autores sugirieron que la posible causa de la hiperhomocisteinemia podía ser una disminución de la remetilación de la Hcy debido a una baja concentración de las formas activas de los folatos o de la B₁₂, o a una deficiencia en las enzimas involucradas en la remetilación. También realizaron un estudio de casos y controles para conocer la prevalencia de la hiperhomocisteinemia en las mujeres con abortos recurrentes de causa desconocida (2 o más abortos), observando cómo el 21% tenían niveles altos de Hcy tras la prueba de carga con Metionina (Met) concluyendo que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo para la pérdida gestacional recurrente.

En un estudio posterior se observó un aumento del riesgo relativo para aborto de repetición en aquellas mujeres con niveles elevados de Hcy y disminuidos de folatos (Nelen et al., 2000).

Estudios observacionales muestran que la hiperhomocisteinemia moderada y los niveles bajos de folatos son factores de riesgo para el aborto habitual. Para explicar el mecanismo por el cual la elevada concentración de Hcy plasmática puede causar la pérdida de la gestación se han formulado dos hipótesis: que ésta interfiera en el desarrollo embrionario normal ó alterando la función vascular.

En múltiples estudios, se ha demostrado la existencia de niveles aumentados de Hcy en mujeres con abortos espontáneos de repetición (Laurence et al., 1981; Stirrat, 1990; Steegers-Theunissen et al., 1992; Wouters et al., 1993; Preston et al., 1996; Nelen et al., 1997; Quere et al., 1998; Obwegeser et al., 1999; Vollset et al., 2000).

1.1.4. Necesidades y recomendaciones dietéticas para folatos

La cantidad de folato que ha sido recomendada como la idónea para asegurar niveles adecuados ha variado en los últimos años entre países. Oscila en un rango de 200 a 400 $\mu\text{g}/\text{día}$. Estas diferencias se derivan de la diferente base científica en la que se fundamenta la recomendación formulada. Estados Unidos fue de los primeros países en emitir recomendaciones (400 $\mu\text{g}/\text{día}$) y en tomar medidas obligatorias para la fortificación de alimentos (*Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline*, 1998) y se basaba en las concentraciones de folatos sérico e intraeritrocitario y Hcy. Por otro lado en Reino Unido la recomendación de 200 $\mu\text{g}/\text{día}$ se fundamentó en la medida de folato intraeritrocitario y la concentración de folato en tejido hepático (*Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN)*, 1991). Estas recomendaciones dependen de lo que se considere un nivel adecuado ya que no sólo debe estar basado en la ausencia de signos y síntomas del déficit de esta vitamina si no en las concentraciones que se precisan en plasma y hematíes para mantener la salud. Es obligatorio mantener un consumo mínimo pero no basta por sí solo para mantener un estatus normal de folatos (Krawinkel et al., 2014). Además, al estimar los requerimientos de folato deben considerarse otros factores como la variedad de folatos con diferente biodisponibilidad y funcionalidad y la diferenciación entre el ácido fólico sintético y folatos de la dieta, así como las variantes genéticas. Entre las variantes genéticas de las enzimas del ciclo de los folatos destaca el incremento de la de la prevalencia del polimorfismo C677T de la MTHFR (Muñoz-Moran et al., 1998) y

por otro lado hay descritos casos familiares con problemas de malabsorción de folatos debido a mutaciones en el gen que codifica el transportador acoplado a protón de la membrana intestinal (*proton-coupled folate transporter*, PCTF) (Zhao et al., 2007). La relevancia del factor genético en cuanto a las recomendaciones de ingesta de folato no está clara en principio y deberían definirse para cada variedad de folato.

Los requerimientos de folato y recomendaciones alimentarios se expresan como equivalentes dietarios de folato (EDF). Tiene en cuenta la mayor disponibilidad del folato sintético que se utiliza en los suplementos y en los alimentos fortificados de manera que se compensa el mayor grado de absorción del ácido fólico en comparación con el folato que se encuentra naturalmente en los alimentos (Bailey, 1998) .

En 2014 el grupo de expertos de la Sociedad Alemana de Nutrición tras una amplia revisión sobre este tema concluye reducir los EDF de 400 a 300µg/día en población general y recomienda suplementos periconcepcionales de 400µg de ácido fólico en el primer trimestre, todo ello en base a mantener folatos séricos por encima de 10nmol/L, folato intraeritrocitario ≥ 340 nmol/L y la Hcy por debajo de 12 µmol/L (Krawinkel et al., 2014).

1.1.5. La controversia del exceso de ácido fólico

Desde que se adoptaron políticas de fortificación obligatoria de alimentos en muchos países entre otras medidas para aumentar la ingesta de folato en la dieta no sólo se ha conseguido reducir la incidencia de DTN y del número de abortos sino que también se ha conseguido un descenso de Hcy (riesgo cardiovascular independiente) y una mejora de los trastornos neuropsiquiátricos. Sin embargo, como esta medida ha expuesto a toda la sociedad a mayor cantidad de folato, han comenzado a describirse efectos adversos.

La capacidad de absorción y biotransformación del ácido fólico se satura a partir de 400 µg/día. Todo parece indicar que el aumento de ácido fólico sin

metabolizar es la clave ya que modula el metabolismo de los folatos. La DHFR es la enzima que convierte el fólico sintético en folato reducido lo que conduce el metabolismo celular de folatos. El ácido fólico para incorporarse al ciclo de los folatos necesita reducirse a THF y lo hace en un primer paso a DHF por medio de la DHFR (con una elevada Km) y a THF después (baja Km de la DHFR). El DHF a su vez modula alostéricamente la MTHFR. La actividad de la DHFR tiene una elevada variación interindividual de hasta 5 veces. Esto es debido a los polimorfismo genéticos descritos en el gen que la codifica DHFR: la inserción/delección de 19pb, los polimorfismos de una sola base (*Single Nucleotide polymorphism, SNP*) C238T, A458T. Por tanto, variantes de DHFR de reducida actividad podrían no ser capaces de incorporar todo el ácido fólico sintético que se ingiere y da lugar a un exceso de ácido fólico intacto, sin reducir.

1.1.5.1 Efectos adversos en SNC relacionado con el déficit de vitamina B₁₂

La vitamina B₁₂ actúa como coenzima en la síntesis de Met por la metionina sintasa (MTR). Esta reacción se ha denominado como “la trampa del folato” (ver figura 4). En caso de déficit de B₁₂ se inhibe la reacción y da lugar a la acumulación de 5-metilTHF y Hcy. Las funciones de ambas vitaminas están interrelacionadas a este nivel y por eso los signos y síntomas de ambas deficiencias son iguales.

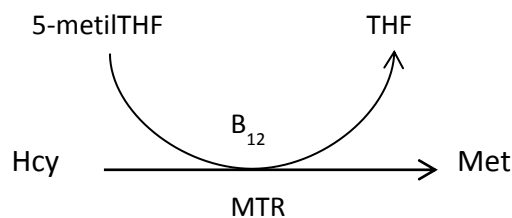


Figura 4: Remetilación de Hcy a Met por acción de la metionina sintasa (MTR)

En el SNC la metilación de la Hcy por la MTR es la única vía de sintetizar Met ya que en el tejido nervioso no está activa la vía de la betaína. La administración

única de ácido fólico en caso de deficiencia de B₁₂ enmascara la sintomatología. El ácido fólico sintético reducido a THF hace posible la síntesis de purinas y pirimidinas mientras que las lesiones neurológicas debidas a una insuficiente producción de Met progresan. Esto imposibilita un diagnóstico temprano de la anemia megaloblástica por déficit de B₁₂, anemia perniciosa, que deja secuelas irreversibles debidas a desmielinización del SNC. La fortificación alimentaria obligatoria no ha mejorado los niveles de B₁₂ por lo es recomendable monitorizar sus niveles y que haya un balance en los aportes de folato y B₁₂ (Choi et al., 2014).

1.1.5.2. Epilepsia y exceso de ácido fólico

Dosis elevadas de folato tienen un potencial excitatorio. El mecanismo por el que sucede no está del todo claro pero en modelos animales se han visto que bloquea la inhibición mediada por el GABA. No obstante la barrera hematoencefálica ejerce un efecto protector ya que impide que el exceso de ácido fólico circulante pase al SNC (Reynolds, 2006). Por otro lado, algunos antiepilépticos reducen el nivel de folato en sangre lo que sería un hecho a tener en cuenta en mujeres en edad fértil en tratamiento con anticonvulsivantes (Krishnamurthy, 2012).

1.1.5.3. Cáncer

Existe controversia en cuanto al efecto de los folatos en la carcinogénesis y es determinante su origen natural o sintético.

La deficiencia de folato puede contribuir a una síntesis aberrante del DNA y a la carcinogénesis debido a descenso en la disponibilidad de Met que interfiere en la metilación normal del DNA. Existen evidencias biológicas y observacionales que sugieren que un aporte adecuado de folato podría prevenir el cáncer en ciertas poblaciones de riesgo (Giovannucci et al., 1995; Giovannucci et al., 1998; Lewis et al., 2006; Larsson et al., 2007). El beneficio de suplementar con ácido fólico no se

ha confirmado mediante ensayos aleatorizados pero sí que se ha visto que podría ser perjudicial en determinados tumores (Cole et al., 2007; Logan et al., 2008; Ebbing et al., 2009; Zhang et al., 2008).

La suplementación con ácido fólico da lugar a una mayor cantidad de éste sin metabolizar circulando con el consecuente riesgo de degradarse en productos genotóxicos que sería un efecto adverso en la era post-fortificación (Choi et al., 2014). En la reciente revisión de Choi y colaboradores de 2014 parece que hay más evidencias de que el folato es perjudicial para el cáncer colorrectal por lo que no sería recomendable suplementar con el único propósito de disminuir el riesgo de padecer cáncer.

1.1.5.4. Eficacia de las terapias “antifolato”

Los fármacos antifolatos se utilizan en quimioterapia. Debido a su semejanza estructural con las formas de folato ejercen su acción inhibiendo las enzimas del ciclo. El metotrexate por ejemplo inhibe la DHFR e interrumpe la síntesis de purinas y dTMP por lo que actúa inhibiendo la síntesis de DNA y así frena la proliferación celular. La elevación de los niveles de folato en sangre debida a suplementación/fortificación con ácido fólico podría interferir en su mecanismo y en la eficacia de la quimioterapia antifolato (Arabelovic et al., 2007).

1.1.5.5. Influencia de la elevación materna en tejido adiposo e insulina

Un estudio llevado a cabo en gestantes indias durante 6 años estableció que concentraciones elevadas de folato en la madre predecía mayor adiposidad e insulinoresistencia en los recién nacidos. La insulinoresistencia era mayor en el grupo de mujeres que tomaron una combinación de folato con B₁₂. Su hipótesis se

fundamentaba en que el folato queda atrapado como 5-metilTHF e incrementaba el metilmalonil CoA daba lugar a mayor lipogénesis (Yajnik et al., 2008).

1.1.5.6. Incremento de los embarazos gemelares

La suplementación vitamínica periconcepcionales ha revelado en dos cohortes suecas y húngara hasta un 40% más de embarazos gemelares (Czeizel et al., 1994; Ericson et al., 2001). En países como Chile y Estados Unidos, con fortificación obligatoria de alimentos con ácido fólico, se ha incrementado la tasa de embarazo múltiple (Signore et al., 2005; Nazer H et al., 2006). Haggarty y colaboradores asociaron concentraciones elevadas de folato sérico e intraeritrocitario con una mejora del éxito de la fertilización in vitro (Haggarty et al., 2006). Esto es algo controvertido ya que el embarazo múltiple supone un riesgo para la morbilidad y mortalidad materna e infantil.

1.1.5.7. Selección genética

Reyes-Engel y colaboradores evidenciaron cómo en los niños nacidos en España tras las medidas de suplementación con folatos en la gestación se ha producido una selección genética dado el incremento de alelos mutados de los SNPs de la MTHFR C677T y A1298C. Estas variantes se han asociado a importantes problemas de salud como el riesgo cardiovascular lo que supone una cuestión importante desde el punto de vista de salud pública (Muñoz-Moran et al., 1998; Reyes-Engel et al., 2002).

1.1.5.8. Trastorno del Espectro autista

El efecto de los suplementos de fólico en el Trastorno del Espectro autista (TEA) se ha considerado como algo protector. De hecho, se ha evidenciado una elevación

plasmática significativa de Hcy, adenosina y SAM en madre con niños con TEA (James et al., 2010). Estudios llevados a cabo en Estados Unidos y Noruega han apoyado este hallazgo con un incremento del TEA del 48 y 49% respectivamente (Schmidt et al., 2012; Surén et al., 2013). Sin embargo hay trabajos recientes que sugieren que la mayor prevalencia de TEA que se viene observando podría estar causada en parte por los suplementos de ácido fólico (Beard et al., 2011; Catherine Desoto, 2011). Para ello se han postulado muchas teorías posibles, entre ellas que el exceso de ácido fólico incrementa el número de niños con el alelo mutado de la MTHFR C677T que en el útero tienen un nivel suficiente de folato pero que no se mantiene tras el nacimiento. Como resultado de esto puede cambiar el patrón de metilación del DNA y elevar la Hcy que incrementaría la incidencia de TEA (Rogers, 2008). Estudios más avanzados han propuesto mecanismos moleculares para este incremento del TEA por el ácido fólico como responsable de la desregulación de la expresión de genes implicados en el desarrollo cerebral (Junaid et al., 2011).

1.2. HOMOCISTEÍNA

1.2.1. Estructura química

La Homocisteína (Hcy) es un aminoácido azufrado no esencial (2-amino-4-sulfamil-ácido butanoico; $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}_2\text{-COOH}$). No se incorpora a la síntesis de proteínas dado que no está codificada por ningún triplete de bases del código genético, sino que es producto de transformaciones estructurales de las proteínas. La Hcy es un producto intermedio del metabolismo de la Met.

La Hcy procedente del metabolismo celular cuando llega al plasma se oxida a forma diversas especies moleculares (figura 5), de forma que solo el 1% de la misma queda como monómeros en forma reducida. Aproximadamente el 20% de la Hcy, se encuentra formando dímeros de Hcy-Cisteína y Hcy-Hcy (homocistina), unidos por puentes disulfuro. Estos dímeros junto con la fracción reducida constituyen la Hcy

libre. El 80% de la Hcy restante constituye la Hcy ligada a proteínas, principalmente a la albúmina, mediante puentes disulfuro (Mansoor et al., 1992; Ueland, 1995).

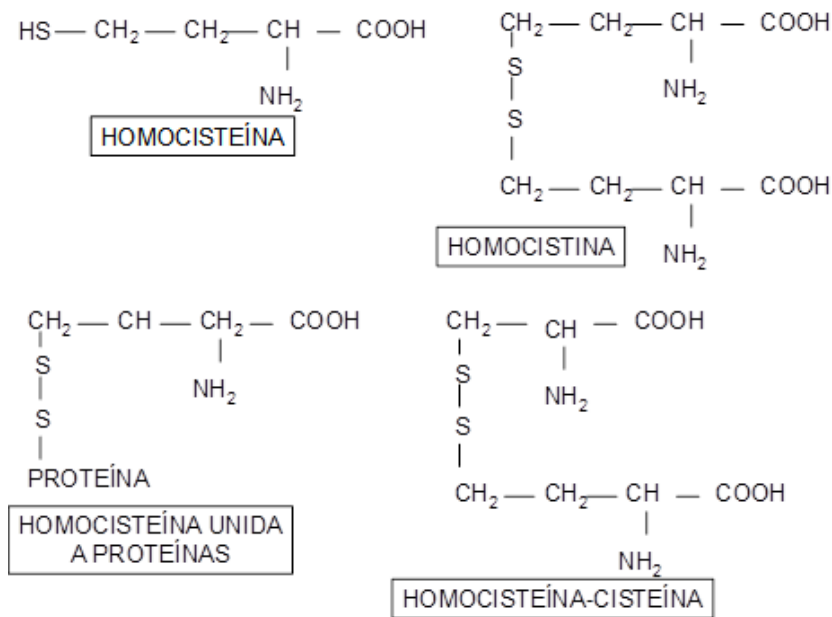


Figura 5: Formas plasmáticas de Hcy

La determinación de Hcy en plasma/suero incluye el conjunto de todas las moléculas mencionadas y su medida es de interés clínico (Refsum et al., 2004).

1.2.2. Metabolismo de la Homocisteína

La Met constituye la única fuente de Hcy en el organismo humano, además, actúa como intermediario en la biosíntesis de cisteína, por la vía de la cistationina. Como hemos mencionado en el apartado 1.1.2 la Met es un aminoácido esencial que además de ser un precursor y componente de péptidos y proteínas, desempeña un papel importante en la transferencia de grupos metilo. El exceso de Met procedente de la dieta o del recambio de las proteínas endógenas que no se incorpora a las proteínas es metabolizado como se describe en la Figura 6 (Córdoba Porras, A et al., 1998).

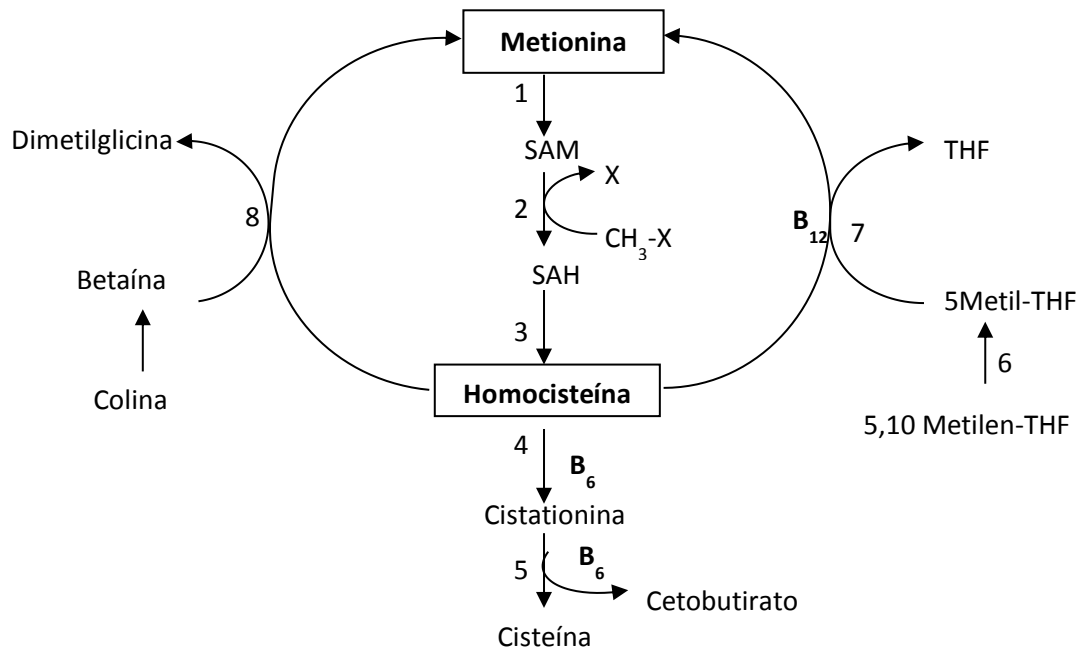


Figura 6: Metabolismo de la homocisteína.

Las enzimas están representadas con la siguiente numeración: 1, L-metionina adenosiltransferasa; 2,metiltransferasa; 3, S-adenosilhomocisteína hidrolasa; 4, cistatióninaβsintasa; 5, cistatiónina γ-liasa; 6, metilen-tetrahidrofolato reductasa; 7, metionina sintasa; 8, betaína-homocisteína metiltransferasa; SAM, S-adenosilmetionina; X, aceptor de metilos; SAH, S-adenosil homocisteína; THF,; tetrahidrofolato.

Existen dos reacciones sucesivas en el paso de Met a Hcy: En la primera, se obtiene un metabolito intermedio, la S-adenosilmetionina o “Met. Activa” (SAM), reacción en la que intervienen la L-Metionina adenosiltransferasa como enzima catalizadora de dicha reacción y el ATP (Figura 7).

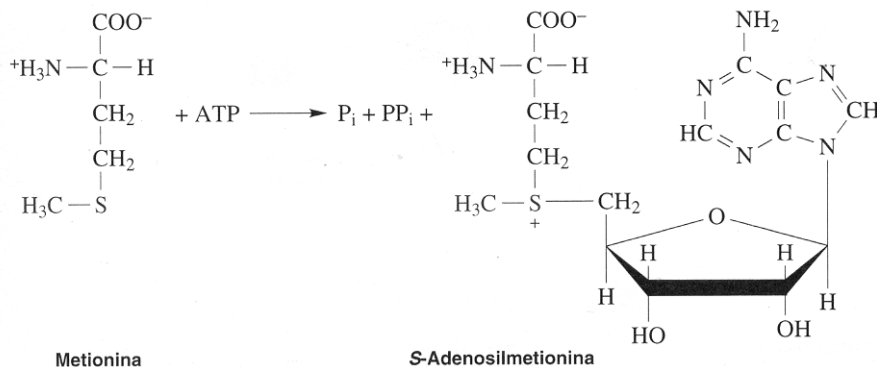


Figura 7. Formación de la S-adenosil metionina

La SAM es el principal dador de metilos del organismo, estando implicado en la biosíntesis de colina, creatinina, adrenalina, melatonina, sarcosina y también participa en la metilación del DNA y RNA.

Tras la demetilación, la SAM se transforma en S-adenosilhomocisteína (SAH) que es posteriormente hidrolizada mediante la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (Figura 8), siendo esta la única fuente de Hcy en vertebrados.

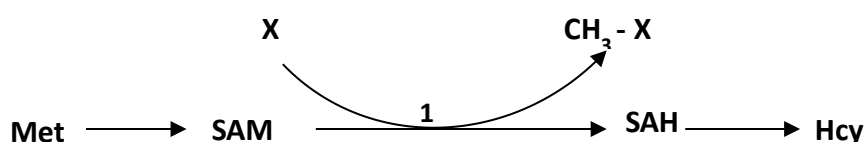


Figura 8. Segundo paso intermedio en la obtención de Homocisteína a partir de Metionina mediante la demetilación de la SAM y posterior hidrólisis de la SAH. 1: S-adenosilmetionina metiltransferasa/hidrolasa.

Una vez que se ha formado la Hcy, ésta puede seguir tres rutas: dos vías de remetilación para la recuperación de Met y una tercera vía que es la de transulfuración para la síntesis de cisteína:

- 1) Vía de la Metionina sintetasa (MTR, EC 2.1.1.13).

Utiliza el ácido 5-metilTHF como cosustrato y la B₁₂ como coenzima. El 5-metilTHF es generado por la enzima MTHFR, a partir del 5,10-metilenTHF. Cuando el 5-metilTHF cede su grupo metilo se transforma en THF. Esta reacción que es esencial para el reciclaje de los folatos desde 5-metilTHF, representa la intersección entre el metabolismo de los folatos y la vitamina B₁₂ (figura 2). La MTR regenera el THF para el transporte de nuevas unidades de formilo, metileno y metilo para la síntesis de purinas y pirimidinas. La MTHFR cataliza la reducción del ácido 5, 10-metilenTHF a 5-metilTHF. En condiciones fisiológicas esta reacción es irreversible y su actividad está regulada por la concentración de SAM. El correcto funcionamiento de esta vía exige tanto un aporte suficiente de folatos y vitamina B₁₂ como una actividad adecuada de la enzima MTHFR.

2) Vía de la Betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT, EC 2.1.1.5)

Utiliza la colina como cosustrato. La betaína es un derivado de la colina, la cual es el componente polar del fosfolípido de membrana más abundante, la fosfatidil colina. La betaína proviene de la oxidación del grupo aldehído de la colina. Esta es la que cede su grupo metilo a la Hcy mediante la enzima BHMT, transformándose en dimetilglicina (Figura 9).

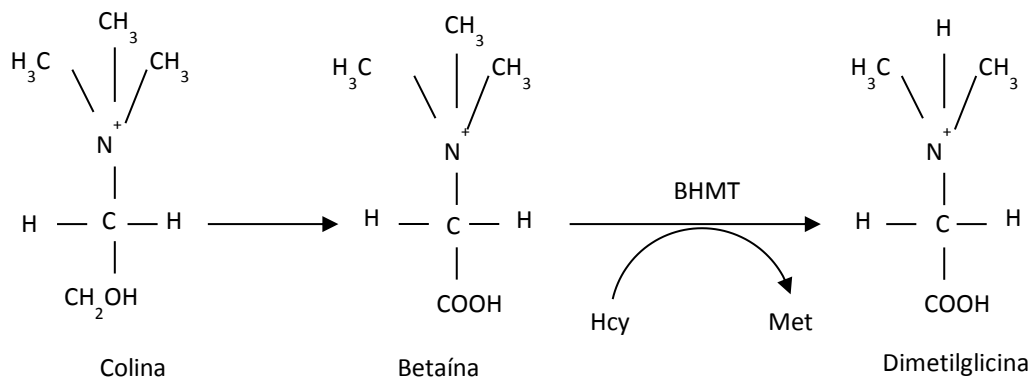


Figura 9. Utilización de Betaína en la recuperación de Metionina.

La BHMT es inhibida reversiblemente por los productos de la reacción, Met, dimetilglicina y por la SAM (Garrow, 1996). La actividad de esta enzima depende de la edad y de factores nutricionales, es 5 a 10 veces más activa que la MTR y presenta dos veces más afinidad por la Hcy que la cistationinaβsintasa (Córdoba-Porras et al., 1996). A pesar de todo ello, su importancia en la recuperación de Met a partir de Hcy es muy pequeña ya que el sustrato, la colina, no suele estar disponible porque es fundamental para la síntesis de fosfolípidos. Además, esta enzima únicamente se encuentra en hígado y riñón, mientras que la recuperación de Met por folatos, está presente en todas las células del organismo.

3) Síntesis de Cisteína

Existe una tercera vía de metabolismo de la Hcy que es la vía de la transulfuración. En ella la Hcy se transforma en cisteína (Cys) en dos reacciones dependientes de la vitamina B₆ (Figura 10). Constituye el primer paso irreversible para el catabolismo de la Hcy mediante la conversión secuencial a cisteína y sulfato inorgánico.

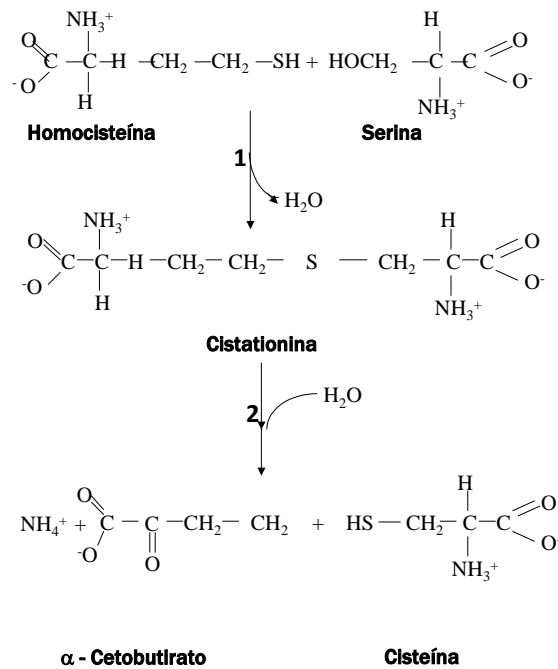


Figura 10. Síntesis de cisteína a partir de Hcy. 1: cistationina-β-sintasa; 2: cistationina-γ-liasa

En la primera reacción, se obtiene cistationina a partir de Hcy y Ser en reacción mediada por la CBS. En la segunda reacción, la cistationina es desaminada por la acción de la enzima cistationina-γ-liasa, obteniéndose Cys y α-cetobutirato. La Cys es oxidada a taurina, importante aminoácido en la función neurotransmisora, a sulfatos inorgánicos o es excretada por la orina.

1.2.2.1. Integración del metabolismo de la homocisteína

Los tres procesos que integran el metabolismo de la Hcy (metilación de Hcy a Met por el ciclo de los metilos, ruta de la colina y transulfuración) están interrelacionados de forma que la actividad enzimática, el incremento en la síntesis de uno u otro producto, la activación o la inhibición de una determinada vía, está condicionada por los niveles de todos y cada uno de ellos.

Es muy importante el papel que juegan las enzimas y coenzimas involucradas en el metabolismo de la Hcy, del mismo modo que el desempeñado por sus efectores (Figura 4). La CBS, en condiciones fisiológicas, induce el equilibrio de la reacción de condensación de la Hcy y la Ser hacia la formación de cistationina. Esta reacción permite eliminar compuestos azufrados del ciclo Hcy-Met.

La concentración plasmática de Met determina si la Hcy seguirá la ruta de la transulfuración o de la remetilación:

- Cuando la concentración plasmática de la Met está aumentada, se produce un incremento en el flujo de la transulfuración y una disminución de la tasa de la remetilación de la Hcy. Esto es debido al control metabólico que ejerce el incremento tisular de SAM, el cual simultáneamente activa la CBS e inhibe la MTHFR hepática (Córdoba Porras, A et al., 1998). Por lo tanto en estas condiciones, hay un aumento de la síntesis de cistationina y en consecuencia de Cys y una disminución de 5-metilTHF. A largo plazo, disminuye la síntesis de enzimas que intervienen en la remetilación (MTHFR) y se incrementa la síntesis de CBS, con lo cual la síntesis de Cys aumenta.
- Cuando la concentración plasmática de Met está disminuida, la concentración de metabolitos y la actividad de las enzimas se dirige en sentido contrario. Este mecanismo de regulación asegura una conservación eficiente de Met a través de la remetilación (Córdoba Porras, A et al., 1998).

El aumento de la síntesis de Hcy o la disminución de su catabolismo, incrementa su paso hacia el espacio extracelular. La tasa de exportación refleja el balance entre la síntesis y la utilización. Por esta razón, la concentración extracelular de Hcy, y en particular, la del plasma, son indicadores de la actividad de las enzimas y de la disponibilidad de coenzimas y sustratos involucrados en su metabolismo (Córdoba Porras, A et al., 1998). La vida media de Hcy total en la sangre oscila entre 12 y 24 horas.

La BHMT cataboliza la remetilación de la Hcy para formar Met, pero en este caso el dador de metilo es la betaína, proveniente de la oxidación de la colina. La BHMT es inhibida reversiblemente por los productos de la reacción, Met y N,N-dimetilglicina y por la SAM (Garrow, 1996). El aumento de actividad de la BHMT en función del aumento ó disminución de la ingesta de Met, indica que la reacción catabolizada por esta enzima, permite mantener las concentraciones de Met en sangre cuando la ingesta de este aminoácido es limitada, y eliminar la Hcy cuando la ingesta de Met es excesiva.

La Hcy es potencialmente tóxica para la célula y es vertida al torrente sanguíneo manteniéndose sus concentraciones plasmáticas dentro de un rango gracias a la remetilación y la transulfuración. En situaciones de exceso de Met se activa la CBS y se inhibe la remetilación. Al revés sucede en situaciones de déficit de Met, en las que se activa la remetilación y aumenta la proporción de Hcy reutilizada como Met. Por tanto, los niveles de folato, vitaminas B₆ y B₁₂ y la actividad de las enzimas implicadas van a ser determinantes en la concentración de Hcy (Blanco Vaca, F. et al., 2002).

1.2.3. Implicaciones clínicas de las alteraciones en el metabolismo de la Hcy

Las alteraciones en el metabolismo de la Hcy se pueden clasificar en homocistinurias e hiperhomocisteinemias.

1.2.3.1. Homocistinurias

Bajo este término se engloba a un conjunto enfermedades graves que son errores congénitos del metabolismo de la Hcy. Están caracterizados desde el punto de vista bioquímico por una eleva concentración de Hcy en plasma y orina consecuencia de un defecto de actividad en alguna de las enzimas implicadas en su metabolismo (Couce ML et al., 2007).

Las manifestaciones clínicas son diversas y afectan a nivel del sistema óseo (osteoporosis), sistema ocular (luxación del cristalino, miopía, glaucoma), sistema nervioso (retraso mental, convulsiones, alteraciones psiquiátricas), y sistema vascular (accidentes cerebrovasculares, enfermedad cardiovascular). La severidad clínica es proporcional al nivel de Hcy acumulado (Olivar Roldán et al., 2012).

Las homocistinurias se clasifican en tipo I, II y III en función de la enzima afectada:

1) Homocistinuria tipo I: Déficit de la CBS

Es la causa más frecuente de homocistinuria y se suele denominar Homocistinuria clásica. La característica bioquímica más sobresaliente en esta enfermedad es la elevación de la concentración plasmática de Hcy y una marcada excreción urinaria de homocistina, homodímero de la Hcy. La severidad de la enfermedad está en relación directa con la concentración urinaria de Hcy. La heterogeneidad genética de esta deficiencia se relaciona con la actividad residual de la enzima, así como por su diferente afinidad por la Ser y el 5-fosfato de piridoxal. Se han definido hasta 30 mutaciones en el gen de la CBS asociadas a la homocistinuria clásica (Kluijtmans et al., 1999; Maclean et

al., 2002; Gaustadnes et al., 2002; Kruger et al., 2003). La mayor parte de las mutaciones del gen que codifica para CBS se localizan entre los exones 2 y 12, afectando de forma principal al 3 y al 8.

2) Homocistinuria tipo II: Déficit de la MTHFR

La hiperhomocisteinemia causada por la deficiencia grave de la MTHFR suele ser menos severa que la presente en la homocistinuria clásica. Sin embargo, las alteraciones neurológicas incluyendo las convulsiones, neuropatía periférica, alteraciones psiquiátricas y retardo mental, son de más rápida evolución que en la deficiencia de la CBS. Se calcula que la frecuencia de esta deficiencia es la décima parte que la estimada para la CBS (Rosenblatt, D, 1995) El examen post-mortem de los individuos afectados reveló trombosis e infartos en las arterias cerebrales, coronaria o renales, ambos semejantes a los observados en los sujetos con deficiencia de CBS. Probablemente, ésta es la mayor causa de muerte en estos pacientes. La severidad de las manifestaciones clínicas es paralela al grado de deficiencia enzimática. Entre los hallazgos bioquímicos en estos pacientes destaca el aumento de Hcy en sangre y en orina, así como la disminución de Met en sangre. Esto último lo diferencia de la homocistinuria clásica.

3) Homocistinuria tipo III: Errores innatos en el metabolismo de la vitamina B₁₂.

En la actualidad se han descrito diez defectos genéticos que afectan al metabolismo de la cobalamina (Cbl), tres de ellos, afectan la absorción y el transporte, y los otros siete la utilización celular y la formación de las coenzimas metilcobalamina o adenosilcobalamina (Fenton, A et al., 1995). Estas últimas han sido denominadas desde la A hasta la F, según el orden cronológico de su descubrimiento. En las mutantes E y G hay una incapacidad para formar la coenzima metilcobalamina y los pacientes presentan homocistinuria, hipometioninemia, anemia megaloblástica, sin acidemia metilmalónica. Estos pacientes responden al tratamiento con cobalamina.

Los mutantes C, D y F cursan con homocistinuria y acidemia metilmalónica debido a la incapacidad para formar ambas coenzimas. Los individuos con la mutación C presentan un cuadro clínico más severo respecto a los individuos con las mutantes D y F. En las mutantes C, D, E, F y G hay alteración en la remetilación, y clínicamente muestran retardo psicomotor, letargo, trastorno de la marcha, anemia megaloblástica y tromboembolismos.

1.2.3.2. Hiperhomocisteinemia

La principal implicación clínica de la elevación de Hcy en sangre es su contribución al riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular (ECV). Puede deberse a causas genéticas o adquiridas.

➤ **Causas genéticas**

La actividad enzimática disminuida de la MTHFR causada por la sustitución de una citosina por una timina en el nucleótido 677 del gen, que origina un cambio de alanina por valina (Frosst et al., 1995) incrementa la susceptibilidad a desarrollar hiperhomocisteinemia moderada. La elevación de Hcy que se ha observado en individuos con concentración sérica de ácido fólico se sitúa en el límite bajo de la normalidad, aunque no lleguen a padecer deficiencia de esta vitamina. Estudios “in vitro” de estabilidad térmica demostraron una sensibilidad térmica (a 46°C) que la diferencia claramente de la enzima presente en la mayoría de la población y de la enzima de pacientes con deficiencia severa. Por esta razón a ésta variante se le suele denominar MTHFR termolábil.

El hecho que la hiperhomocisteinemia no es un hallazgo consistente en los homocigotos para la variante termolábil sugiere que otros factores adicionales y diferentes a los genéticos (Ej.: folatos séricos disminuido) son

necesarios para que la concentración de Hcy en sangre se incremente. Estamos, por tanto, ante un claro ejemplo de interacción genética (variante termolábil) y ambiente (ingesta de fólico), que influyen en la susceptibilidad a padecer hiperhomocisteinemia y, por tanto, ECV.

➤ **Causas adquiridas**

a. Déficit de vitamina B₁₂

En los pacientes con evidencia clínica de deficiencia de esta vitamina, la concentración basal de Hcy está elevada en prácticamente todos los casos. Debido a que el metabolismo de la Hcy es muy sensible a la disminución intracelular de B₁₂, la medición de Hcy en plasma es un buen indicador del estatus intracelular de esta vitamina, aún en casos en los cuales las concentraciones séricas de cobalamina están en el intervalo de la normalidad.

b. Déficit de folato

La deficiencia de ácido fólico induce hiperhomocisteinemia en un porcentaje altísimo de casos. Incluso cuando la concentración de ácido fólico está ligeramente disminuida (deficiencia subclínica), las probabilidades de desarrollar hiperhomocisteinemia son muy altas.

c. Déficit de vitamina B₆

La deficiencia de B₆ afecta significativamente la velocidad de las reacciones que transforman la Hcy en cisteína al disminuir la actividad de las enzimas CBS y cistationasa-γ-liasa e inducir un aumento de las concentraciones de Hcy en sangre post-metionina.

➤ Otros factores

a. Situaciones clínicas

En los pacientes con insuficiencia renal crónica, la concentración de Hcy en sangre se encuentra aumentada entre 1,95 y 3,6 veces respecto a los controles (Bostom et al., 1996; Vychytil et al., 1998) y se ha relacionado con mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedad vascular prematura. Sin embargo, a diferencia de las otras causas de hiperhomocisteinemia adquiridas, la respuesta de los pacientes con insuficiencia renal al tratamiento polivitamínico es muy limitada (Selhub et al., 2000).

En el hipertiroidismo, aunque no hay una explicación clara, se produce un aumento moderado de la concentración de Hcy. En cáncer y en algunas enfermedades inflamatorias crónicas puede existir una mayor demanda vitamínica que conduce a la aparición de hiperhomocisteinemia. En enfermedades hepáticas, especialmente en la cirrosis el aumento está relacionado con la disminución de la remetilación. (Blanco Vaca, F. et al., 2002).

b. Fármacos

Los fármacos como el metotrexate y sus metabolitos hepáticos, los poliglutamatos, inhiben la enzima DHFR. Al interferir en la remetilación de la Hcy inducen hiperhomocisteinemia. Las fenotiazinas, los antidepresivos tricíclicos, los contraceptivos orales, los tuberculostáticos y el trimetoprim pueden actuar por mecanismos similares.

Los fármacos antiepilépticos como la fenitoína, el fenobarbital, la primidona, la carbamazepina y el ácido valpróico también influyen negativamente el metabolismo del ácido fólico, disminuyendo su absorción intestinal y alterando algunas de las enzimas involucradas en la transferencia de un átomo de carbono, induciendo por ello deficiencia de folato e hiperhomocisteinemia.

El óxido nítrico empleado como anestésico oxida el cobalto de la B₁₂, bloquea el transporte de grupos metilos por la cobalamina, e inactiva irreversiblemente la MTR, por lo que induce hiperhomocisteinemia.

El azaribine (triacetato-6-azaurine) empleado en el tratamiento de la psoriasis refractaria interfiere con la síntesis de uridina-5-monofosfato, es un antagonista de la vitamina B6, y por ello inhibe la CBS e induce aumento de la concentración de Hcy en la sangre (especialmente detectado por sobrecarga de Met). La isoniazida, cicloserina, hidralacina, carbamacepina y la teofilina también interfieren con la función de la vitamina B6.

c. Hábitos

El tabaquismo, consumo excesivo de café o alcohol y el sedentarismo pueden aumentar de forma ligera las concentraciones plasmáticas de Hcy.

1.2.3.3. La homocisteína como factor de riesgo cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Se clasifican en:

- Hipertensión arterial
- Cardiopatía coronaria
- Enfermedad cerebrovascular
- Enfermedad vascular periférica
- Insuficiencia cardíaca
- Cardiopatía reumática
- Cardiopatía congénita
- Miocardiopatías

(WHO, World Heart Federation, World Stroke Organization, 2011)

Las ECV constituyen una de las causas más importantes de discapacidad y muerte prematura en todo el mundo. El problema subyacente es la aterosclerosis, que progresa a lo largo de los años, de modo que cuando aparecen los síntomas, generalmente a mediana edad, suele estar en una fase avanzada. Los episodios coronarios (infarto de miocardio) y cerebrovasculares (ataque apopléjico) agudos se producen de forma repentina y conducen a menudo a la muerte antes de que pueda dispensarse la atención médica requerida.

La modificación de los factores de riesgo puede reducir los episodios cardiovasculares y la muerte prematura tanto en las personas con ECV establecida como en aquellas con alto riesgo cardiovascular debido a uno o más factores de riesgo. A pesar de los grandes progresos realizados en los últimos años sobre la prevención de la ECV, ésta sigue teniendo la morbi-mortalidad más alta del mundo. De hecho, las muertes por ECV afectan por igual a ambos sexos, y más del 80% se producen en países con ingresos medios y bajos, principalmente porque no pueden beneficiarse de los programas de prevención. La causa subyacente más frecuente es la aterosclerosis (*WHO, World Heart Federation, World Stroke Organization, 2011*).

El control de los factores de riesgo (FR) que predisponen a sufrir ECV se asocia de forma significativa a una disminución de la morbilidad y mortalidad cardiovascular. El riesgo cardiovascular es la probabilidad de que una persona sufra ECV en un periodo definido en el futuro. Se denominan FR clásicos o mayores al grupo siguiente:

- Hipertensión arterial
- Alteraciones del metabolismo lipídico
- Diabetes
- Historia familiar de enfermedad coronaria prematura
- Tabaquismo.

Muchos de estos factores con frecuencia interactúan y actúan sinérgicamente, siendo difícil establecer el impacto que cada factor ejerce individualmente sobre el riesgo cardiovascular. Los FR clásicos son capaces de explicar

aproximadamente el 80% del riesgo poblacional y su control ha demostrado disminuir el RCV entre un 35-50% en 5 años en población de alto riesgo. No obstante, estos FR clásicos no explican completamente la aparición de la ECV, ya que, en torno al 20% de los accidentes coronarios sucede en individuos en los que no se detecta ninguno de ellos, lo que representa una importante limitación. Para mejorar la evaluación del riesgo de ECV, sin menospreciar la enorme validez de los FR clásicos, emerge la necesidad de identificar nuevos. Las recomendaciones internacionales ya consideran a estas magnitudes y las denominan FR emergentes de ECV, existiendo para algunos de estos factores suficientes evidencias científicas de su contribución a la enfermedad. Sin embargo, solo unos pocos de estos factores han sido validados e incorporados en las recomendaciones científicas (FR emergentes consolidados); este es el caso de las concentraciones plasmáticas de lipoproteína a, Hcy y de proteína C reactiva medida con métodos de elevada sensibilidad (Assmann et al., 2005).

Los estudios que han analizado la relación entre hiperhomocisteinemia y ECV en general, y que ya incluyen más de 80 estudios clínicos y epidemiológicos en los que se han estudiado más de 10.000 personas, han demostrado de una forma bastante consistente que un porcentaje notable de los pacientes con diferentes tipos de ECV presentan con frecuencia hiperhomocisteinemia basal y/o post-Met (Klerk et al., 2002).

Se considera que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo vascular independiente, gradual (por cada incremento de 5 $\mu\text{mol/L}$ se calcula un incremento de riesgo de 1,9) y causal (Boushey et al., 1995).

➤ **Mecanismos patogénicos**

Los mecanismos por los que la hiperhomocisteinemia se convierte en un factor de riesgo cardiovascular y contribuye al proceso de la arteriosclerosis no están del todo claros. Estudios en modelos animales han demostrado que el aumento de las concentraciones plasmáticas de Hcy ocasiona un incremento del estrés oxidativo, daño

en la función endotelial e incrementa la trombogenicidad, lo que favorece la aterosclerosis (Wierzbicki, 2007).

El mecanismo inicial postulado por el cual la hiperhomocisteinemia causa arteriosclerosis y trombosis es una agresión a las células endoteliales provocada por las especies reactivas de oxígeno durante la autooxidación de la Hcy en el plasma, o bien un efecto citotóxico directo de las mismas (Welch and Loscalzo, 1998; Derouiche et al., 2014). La lesión endotelial disminuye la producción de óxido nítrico y ésta, a su vez, provoca una tendencia a la vasoconstricción, una mayor proliferación de células musculares lisas de la pared arterial, alteración de la síntesis de colágeno y depósito de tejido fibroso y matriz glicoproteica en la pared de los vasos con destrucción de fibras elásticas de la pared vascular (McCully, 2007).

Otro mecanismo que se ha implicado es el de la oxidación de las LDL por los productos de autooxidación de la Hcy, homocistina y homocisteína-tiolactona, que producen en el hígado agregados de LDL-Hcy que presentan una mayor afinidad por la fibrina cuando alcanzan el torrente sanguíneo, son captados por los macrófagos de la pared arterial que los degrada, liberando colesterol que se deposita en las arterias formando placas de ateroma. Además, la homocisteína-tiolactona, también altera el metabolismo de las células endoteliales, favoreciendo la formación de más radicales libres y produciendo más daño endotelial (McCully, 2009).

Por otro lado, como mecanismos patogénicos de la Hcy en la ECV se han descrito: el efecto promotor de la multiplicación de las células musculares lisas, la disminución de la síntesis de DNA en las células endoteliales y el incremento de la agregación plaquetaria mediada por el tromboxano que contribuye a la acción protrombótica y a la lesión endotelial de la Hcy (Seshadri and Robinson, 2000).

1.2.4. Valores de referencia

Los valores de referencia poblacionales de Hcy plasmática, calculados estadísticamente según los percentiles 2,5 y 97,5, según la mayor parte de los estudios

realizados en los países occidentales, se sitúan entre 5 y 16 $\mu\text{mol/L}$. El límite superior para ambos sexos casi idéntico siendo más elevado en los varones.

En la tabla 2 se recogen los límites superiores de referencia establecidos por Refsum (Refsum et al. 2004) basándose en datos publicados por estudios poblacionales, establece los límites superiores de referencia en individuos presumiblemente sanos con y sin suplemento de folatos. Existe controversia acerca de si los límites de referencia deberían basarse en la medición de la concentración de Hcy en individuos de referencia o solo en aquellos con un estado vitamínico óptimo. En este trabajo concluyen que sin suplementación de folatos, los niños menores de 15 años y las mujeres embarazadas presentan el mismo límite superior de referencia (10 $\mu\text{mol/L}$), los adultos un 50% más altos (15 $\mu\text{mol/L}$) y los ancianos un 100% más altos (20 $\mu\text{mol/L}$).

	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	
	Con suplementación	Sin suplementación
Niños <15años	8	10
Adultos 15-65 años	12	15
Mayores 65 años	16	20
Gestantes	8	10

Tabla 2: Límites de referencia superiores de Hcy en ayunas.

Se indica concentración en ($\mu\text{mol/L}$). Adaptado del Documento de consenso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Molecular 2014: Utilidad clínica y recomendaciones para la medición de la concentración de homocisteína como factor de riesgo cardiovascular (Arrobas Velilla, T. et al., 2015).

Desde un punto de vista clínico, teniendo en cuenta la implicación de la Hcy en el riesgo cardiovascular las guías americanas (*National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)*, 2002) y europeas (Perk et al., 2012), recomiendan utilizar un valor discriminante a partir del cual existe relación con el riesgo de padecer ECV, siendo este valor de 12 $\mu\text{mol/L}$. Sin embargo, dada la intensidad de la relación entre la concentración plasmática de Hcy y el riesgo cardiovascular, y su carácter

gradual y continuo, la guía de práctica clínica de la *National Academy of Clinical Biochemistry* recomienda una concentración deseable de Hcy no superior a 10 $\mu\text{mol/L}$ en los individuos que ya han presentado manifestaciones clínicas de arteriosclerosis o trombosis venosa. Se consideran intermedias o límites las concentraciones de Hcy entre 10-15 $\mu\text{mol/L}$, altas entre 15 y 30 $\mu\text{mol/L}$ y muy altas las iguales o superiores a 30 $\mu\text{mol/L}$ (*NACB LMPG Committee Members et al., 2009*).

Las diferencias entre sexos de los niveles de Hcy son conocidas y están ampliamente descritas en la bibliografía (Boers et al., 1983; Blom et al., 1988; Selhub et al., 1993; Lussier-Cacan et al., 1996; Jacques et al., 1999; Fukagawa et al., 2000; Jacques et al., 2001; Ganji et al., 2003; Lindeman et al., 2003; MacFarlane et al., 2011) por lo que es conveniente manejar diferentes rangos de referencia entre sexos (Alfthan et al., 2003).

1.3. TRATAMIENTOS CON FOLATOS

Con el objeto de aumentar y/o adecuar la ingesta de ácido fólico en la población, se han llevado a cabo tres estrategias: educación nutricional para aportar más folatos a través de la dieta, suplementación farmacológica; y la fortificación de alimentos obligatoria o voluntaria. Cada una ha sido utilizada, de forma conjunta o individual, con mayor o menor éxito en distintos países.

1.3.1. Formas de administración de folatos: folatos sintéticos

El folato sintético más utilizado en fortificación de alimentos y en preparados farmacológicos es el ácido fólico que para tener actividad biológica debe reducirse a THF por medio de la DHFR. Se incorpora al ciclo metabólico como THF.

El 5-formilTHF o ácido folínico es un folato natural que se ha conseguido sintetizar y se utiliza como preparado farmacológico. A diferencia del fólico, es un

monoglutamato ya reducido por lo que no requiere reducción previa para tener actividad biológica y porta un grupo formilo. Presenta mayor estabilidad que el ácido fólico y tiene mayor vida media. El isómero 6S o ácido levofolínico (figura 11) tiene una actividad superior a la del 6R. La biodisponibilidad del folínico tras su administración oral es del 92% (McGuire et al., 1988) y es metabolizado en su mayoría a 5-metilTHF directamente durante la absorción intestinal. En el trabajo de Hauser y colaboradores la administración de ácido levofolínico intravenoso resultó ser más eficaz que la de ácido fólico para prevenir la hiperhomocisteinemia en pacientes sometidos a hemodiálisis (Hauser et al., 2001).

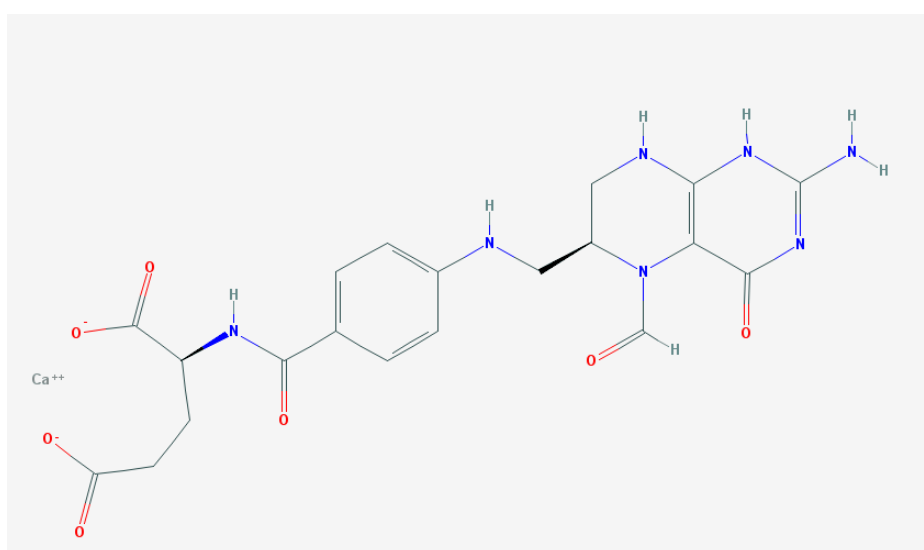


Figura 11: Levofolinato cálcico

El 5-formilTHF tiene un efecto neto igual al de la forma metabólicamente activa de folatos, el 5-metilTHF, que también ha sido sintetizado y utilizado en preparados farmacológicos (Kelly, 1998). La principal ventaja del 5-metilTHF es que precisa de la MTR y de la vitamina B₁₂ para ser utilizada en la remetilación de la Hcy por lo que no enmascararía un déficit de B₁₂. El ácido fólico se incorpora al metabolismo reducido como THF por la DHFR. El THF se dirige a la síntesis de timidilato, por lo que eritropoyesis estaría cubierta si bien las reacciones de metilación en caso de déficit de B₁₂ no lo estarían (Scott y Weir, 1981). Por otro lado, la administración de ácido fólico en contra de lo que sucede con las formas reducidas y metiladas de folato, deja en sangre un remanente de ácido fólico sin metabolizar con los consecuentes efectos adversos a largo plazo (ver apartado 1.1.5.). Este hecho ya lo evidenciaron en 2002

Ghandour y colaboradores en pacientes en diálisis a los que administraron levofolínico y fólico. Hicieron una comparación de las diferentes formas de folato circulante tras la administración de ambos tratamientos y observaron que en el grupo del folínico la práctica totalidad del folato estaba como 5-metilTHF mientras que en el grupo del fólico hasta el 70% era ácido fólico sin metabolizar (Ghandour et al., 2002).

Los estudios que se han llevado a cabo en materia de biodisponibilidad y seguridad del 5-metilTHF respecto al ácido fólico sintético son favorables a la suplementación con 5-metilTHF. Existen además diferencias interindividuales en la capacidad para reducir y metilar el ácido fólico. Los polimorfismos de ciertos genes del metabolismo de los folatos (MTHFR, DHFR) hacen del 5-metilTHF una mejor opción para incorporar el folato. El 5 metil THF es la forma natural mayoritaria y está lista para su transporte y metabolismo en el organismo. Por último no existe en el 5-metilTHF un límite máximo tolerable y sí en el ácido fólico (Obeid et al., 2013).

1.3.2. Fortificación alimentaria con ácido fólico

En 1998 Estados Unidos implantó de forma obligatoria la fortificación con ácido fólico. Consiste en la adición de ácido fólico, de forma obligatoria y regulada, a productos derivados de cereales y harina que son comúnmente consumidos por la población diana (mujeres en edad fértil entre 16 y 44 años). De esta forma se ha conseguido reducir la incidencia de DTN. Esta práctica se ha llevado a cabo en muchos países. Sin embargo han emergido evidencias de efectos adversos inesperados asociados al aumento de la ingesta de folato. De hecho, Europa es reticente a introducir esta medida hasta una mejor evaluación de las consecuencias de una mayor exposición a esta vitamina. En España se fortifican los alimentos con ácido fólico de forma voluntaria, lo cual supone la adición de la vitamina de acuerdo a los criterios de la industria alimentaria. En los últimos años se ha observado en España una fuerte irrupción de alimentos fortificados con ácido fólico en respuesta a la demanda del consumidor. La necesidad de su introducción en la alimentación diaria es muy

controvertida ya que, si bien su aparición responde a las demandas del consumidor, que reconoce la dieta como factor determinante en la prevención de enfermedades, surge el interrogante acerca de los riesgos que podrían derivar del consumo de una amplia variedad de alimentos modificados en su composición (Samaniego Vaesken et al., 2009).

1.3.3. Evaluación del tratamiento con folatos

En la literatura científica hay una extensa colección de trabajos acerca de los tratamientos con folatos llevados a cabo en diversas poblaciones y patologías. La mayoría de estudios se han llevado a cabo con ácido fólico que es la forma folato sintético más utilizada.

Entre los biomarcadores clásicos considerados como de respuesta al tratamiento con folatos se encuentran los folatos circulantes (sérico/plasmático) e intraeritrocitario así como la Hcy.

El folato sérico es el indicador más precoz de la exposición a folatos y refleja una ingesta reciente del mismo (Gibson, 2005). El folato intraeritrocitario junto con el hepático está considerado una medida de las reservas tisulares de folato (Wu et al., 1975). Comparado con el sérico, el folato intraeritrocitario responde de una manera más lenta a la administración de folatos y es un mejor indicador del consumo en los últimos 3 meses, en los que el folato se incorpora a los eritrocitos maduros (Gibson, 2005).

El metabolismo normal de la Hcy requiere un aporte adecuado de folato y la determinación de Hcy constituye un biomarcador funcional del estatus de folato. Sin embargo, siendo rigurosos el descenso de Hcy no sería estrictamente un marcador de respuesta a una dosis determinada de folato ya que depende también de los niveles de vitamina B₁₂, B₆, de los hábitos de vida y el grado de insuficiencia renal (Refsum et al., 2004). No obstante la evaluación del descenso de Hcy tras tratar con folatos a diferentes dosis ha sido el objeto de múltiples trabajos por su importancia como factor independiente de riesgo cardiovascular.

En cuanto a la dosis utilizada se ha visto en un reciente meta-análisis que la respuesta oscila de una manera dosis-dependiente (Duffy et al., 2014). Estos autores llevaron a cabo la revisión de 19 trabajos en una población adulta sana a los que se administró una dosis de ácido fólico en un rango de 50 a 5000 $\mu\text{g}/\text{día}$. La duración del tratamiento osciló entre 2 y 156 semanas con determinaciones de folato sérico e intraeritrocitario en el momento basal y al final del tratamiento. Salvando las diferencias en los métodos de medida de folato, concluyeron que el predictor más importante en la elevación de los biomarcadores fue la dosis. Así, un incremento del doble de dosis supone la variación de folato sérico e intraeritrocitario del 63% y 31% respectivamente. A partir de 500 $\mu\text{g}/\text{día}$ el incremento observado fue menor en comparación con dosis más bajas. La explicación a este fenómeno ya la postuló Cooperman en el año 1970: el aumento de la ingesta de folato podría exceder la capacidad de reabsorción renal y gran parte de la dosis se perdería por la orina.

La edad es un factor a tener en cuenta a la hora de evaluar un tratamiento con folatos. Los trabajos llevados a cabo en neonatos (Hogeveen et al., 2010), adultos jóvenes y mayores de 50 años (de Meer et al., 2005) han evidenciado diferencias en cuanto a los biomarcadores que miden la respuesta al tratamiento. La evaluación del estatus de folatos y niveles de Hcy tras la fortificación alimentaria en EEUU puede ser el trabajo de mayor envergadura en cuanto a la evaluación de un tratamiento con folatos. Ganji y Kafai en 2009 tras evaluar el efecto pre/post-fortificación del *National Health and Nutrition Examination Surveys* en 16254 sujetos (Ganji and Kafai, 2009) concluyeron que la edad es uno de los principales determinantes del descenso de Hcy en la era postfortificación si bien en mayores de 60 años no lo relacionan directamente con el estatus de folato. En esta intervención realizada en EEUU tanto el folato sérico como el intraeritrocitario fueron significativamente superiores en personas mayores comparado el grupo de jóvenes (Ganji and Kafai, 2006). Con la edad desciende la actividad de las enzimas que metabolizan la Hcy (Gartler et al., 1981), empeora la función renal (Norlund et al., 1998) y hay una deficiencia de vitamina B₁₂ debido a malabsorción intestinal asociada al envejecimiento (Asselt et al., 1998).

Por otro lado, se ha evidenciado que ciertos polimorfismos genéticos funcionales de las enzimas de ciclos de los metilos y del metabolismo de folatos pueden variar la utilización del folato. Este aspecto lo abordaremos en el apartado 1.5. Polimorfismos genéticos del ciclo de los metilos-folato.

1.4. DIMORFISMO SEXUAL

El dimorfismo sexual, la diferenciación entre sexos o géneros son términos indistintamente utilizados para designar las características que distinguen a hombres de mujeres. El carácter primario que distingue un género del otro son los ovarios y testículos y está directamente relacionado con la reproducción humana. Por otro lado, los caracteres sexuales secundarios que diferencian ambos sexos son consecuencia de la diferente producción hormonal masculina y femenina.

En investigación biomédica, se ha hecho cada vez más evidente que el género tiene un profundo impacto sobre el metabolismo. Las diferencias de género en el metabolismo han sido bien descritas. Las mujeres parecen oxidar mejor los hidratos de carbono tras la ingesta y cuando la demanda energética aumenta durante la actividad física, el gasto energético está cubierto por una mayor oxidación de grasas en la mujer. Todos estos hallazgos inclinan el género femenino a una mayor flexibilidad metabólica, ya que la oxidación de sustratos se ajusta de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes en situaciones determinadas. A nivel molecular, el músculo esquelético femenino parece estar más preparado para el almacenamiento de lípidos así como para su oxidación, lo que contribuye a mantener el depósito de triglicéridos intramiocelular alto. Las diferencias moleculares en el metabolismo podrían reflejar una adaptación evolutiva en hombres y mujeres que surge de las diferentes necesidades para la reproducción humana. En la gestación y lactancia aumentan las necesidades nutricionales lo que hace que las mujeres hayan desarrollado la capacidad de almacenar grasa en forma depósitos de rápida disponibilidad como el músculo esquelético. Hoy en día donde prevalece una abundancia alimentaria, la mayor

capacidad de almacenamiento de grasa en las mujeres da lugar a sobrellevar mejor un exceso de lípidos y de esta manera mejorar la tolerancia a la glucosa (Lundsgaard and Kiens, 2014).

Se ha demostrado la importancia que el estradiol tiene en la regulación del metabolismo. El trabajo llevado a cabo por Moran y colaboradores en adolescentes pone de manifiesto un dimorfismo sexual metabólico tras la pubertad: en el grupo masculino hallaron aumento de la insulinoresistencia junto con mayor concentración de triglicéridos y descenso en el colesterol HDL, a pesar de una reducción de la masa grasa mientras que ocurrió lo contrario en mujeres (Moran et al., 2008). En mujeres menopaúsicas en las que se produce un descenso drástico de estradiol hay una mayor susceptibilidad a tener desórdenes metabólicos y desarrollar finalmente síndrome metabólico (Polotsky and Polotsky, 2010).

1.4.1. Dimorfismo sexual en el metabolismo de los folatos-Hcy

Si empleamos el nivel de Hcy como indicador del estatus de folatos y del funcionamiento del ciclo de los metilos desde el punto de vista del género podemos decir que existe dimorfismo sexual. La utilización de los folatos entre géneros es diferente por la mayor concentración de Hcy en hombres respecto de las mujeres. Diversos autores constataron este hecho ya en los años 80 (Boers et al., 1983; Blom et al., 1988; Jacques et al., 1999).

Estas diferencias se observan en mujeres premenopáusicas y desaparecen en el climaterio (Brattström et al., 1985). La hipótesis de que los estrógenos son responsables bien directa ó indirectamente del funcionamiento del ciclo de los folatos se ha demostrado en diferentes trabajos y desde diferentes perspectivas:

- En mujeres los niveles de Hcy varían en función de la fase del ciclo menstrual siendo superiores en la fase folicular en la que el estradiol está disminuido respecto a la fase lútea (J. Tallova et al., 1999).

- La gestación es otra situación fisiológica en la que los niveles de estradiol se elevan y en la que se ha observado un descenso de Hcy (Kang et al., 1986).
- El uso de anticonceptivos orales (etinil estradiol) se ha asociado a menor concentración de Hcy respecto a mujeres que no los toman (Morris et al., 2000) así como la terapia hormonal sustitutiva en la menopausia (Friso et al., 2007).

Otro aspecto asociado al metabolismo de los folatos es la utilización de la Met. En mujeres se han descrito mayores tasas de transmetilación de SAM y remetilación de Hcy, lo que indica que la utilización de los metabolitos de la Met y el funcionamiento de la vía metabólica puede diferir entre sexos (Fukagawa et al., 2000). Con el fin de establecer el mecanismo por el cual esto sucede se ha tratado de buscar una regulación de este metabolismo basado en las diferencias hormonales (estradiol y testosterona) entre géneros:

- La administración oral de estradiol en mujeres postmenopáusicas en el trabajo llevado a cabo por Smolders y colaboradores no resultó tener efecto en los niveles de SAM y SAH y el descenso en la Hcy lo atribuyeron en parte al cambio que los estrógenos ejercen en la albúmina (Smolders et al., 2005).
- En trabajos de experimentación animal se ha visto por un lado que la extirpación de la hipófisis elimina las diferencias entre sexos en cuanto a la expresión de la glicina-N-metiltransferasa (que regula los niveles de SAM) lo que sugiere un posible efecto de los andrógenos en el ciclo de los metilos (Aida et al., 1997) y en ratones hembras se ha observado mayor remetilación de la Hcy a Met por la vía de la colina-betaína que en machos (Chew et al., 2011).
- La regulación de la actividad de la CBS renal por la testosterona ha sido estudiada en ratones (Vitvitsky et al., 2007) bajo la hipótesis de que la Hcy en el género masculino es menor en esta especie debido al efecto regulador de la

testosterona en la CBS renal. Vitvitsky y colaboradores detectaron menor expresión y actividad de la CBS renal en ratones castrados y pero no en hembras tras la ovariectomía. Al contrario que en humanos, las hembras presentan mayor concentración de Hcy. Con ello justifican una elevación de Hcy debido a una menor eliminación de la misma por la vía de la transulfuración. Estos autores sugieren que la testosterona sería determinante en las diferencias de género en cuanto a los niveles de Hcy en humanos debido a la menor actividad renal de la CBS en hombres que determinan en este mismo trabajo en muestras de tejido renal.

Estos hallazgos metabólicos trasladados al estudio de una patología concreta podrían resultar en mayor riesgo para un sexo que para el otro. Por ejemplo, en el trabajo de Shrubsole y colaboradores se asocian mayores niveles plasmáticos de SAM y SAH con un menor riesgo de adenoma colorrectal en hombres. Sin embargo el incremento de SAM y SAH en mujeres sería un factor de riesgo para esta patología (Shrubsole et al., 2014). Estos autores explican este efecto de la SAM por su efecto inhibidor alostérico de la MTHFR. Establecen que sería posible que entre los hombres y en el contexto de la amplia disponibilidad de SAM, la actividad de MTHFR se reduzca y que el folato esté más disponible para la síntesis de nucleótidos en lugar de para remetilación de la Hcy. En teoría, esto podría dar lugar a la disponibilidad adecuada de sustratos importantes para la metilación, disminuyendo el riesgo de carcinogénesis.

1.4.2. Dimorfismo sexual en polimorfismos genéticos

El comportamiento diferencial de una variante genética según el sexo ha sido tratado en diferentes patologías con desigual presentación entre hombres y mujeres.

La actividad de la catecol-O-metiltransferasa (COMT), implicada en el metabolismo de la dopamina, está directamente relacionada con la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. Se trata de una enfermedad neurodegenerativa

caracterizada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo. El SNP rs4680, que origina la sustitución de Valina (Val) por Met en posición 158 tiene un efecto de elevada (Val/Val), intermedia (Val/Met) y baja actividad (Met/Met) de la COMT (Lachman et al., 1996). Existe un dimorfismo sexual en este polimorfismo genético ya que en hombres el genotipo de baja actividad enzimática se ha asociado a una aparición más temprana de la enfermedad de Parkinson no hallada en mujeres (Klebe et al., 2013).

Otro ejemplo de dimorfismo sexual en un polimorfismo genético es el hallazgo de Verma y colaboradores en trastornos del espectro autista (TEA) y el rs6323 de la Monoamino-oxidasa A (MAOA) (Verma et al., 2014). El genotipo de baja actividad de la MAOA de este SNP resulta en un menor metabolismo de la serotonina, neurotransmisor implicado en el control del comportamiento, humor, memoria, aprendizaje y con funciones endocrinas. El TEA es más frecuente en hombres que en mujeres en una proporción de 4:1 y tiene una base genética no dilucidada por completo. En el gen de la MAOA se ha descrito varios polimorfismos, y en la búsqueda de la combinación de variantes genéticas que puedan estar implicadas en la patogénesis de esta enfermedad, estos autores han encontrado una significación estadística del rs6323 en hombres que no se presenta en mujeres.

1.5. POLIMORFISMOS GENÉTICOS RELACIONADOS CON EL TRANSPORTE, METABOLISMO DE LOS FOLATOS Y CICLO DE LOS METILOS

Los folatos actúan como transportadores de metilos y todas las células del organismo precisan de un adecuado nivel de folato para que sean posibles la síntesis de pirimidinas y purinas, las reacciones de metilación y la eliminación de Hcy. Un aporte adecuado de folatos es fundamental para el funcionamiento del ciclo pero hay suficiente evidencia de que la susceptibilidad genética subyacente juega un importante papel pudiendo causar alteraciones en la disponibilidad, metabolismo y distribución de intermediarios en la vía metabólica de los folatos.

La asociación de variantes genéticas comunes en las enzimas implicadas en el metabolismo de los folatos y el riesgo de la enfermedad se remonta a 1995, cuando se asoció el primer polimorfismo funcional relacionado con el folato (MTHFR C677T) al riesgo cardiovascular. Desde entonces se han identificado numerosos polimorfismos en los genes relacionados con el ácido fólico y se ha tratado de probar su funcionalidad, bien como un modulador de los niveles de folatos, Hcy ó asociarlos al riesgo de enfermedad (DTN, cáncer, etc). Por otra parte, cada vez hay más investigación sobre la importancia de los derivados monocarbonados de folato y las reacciones de metilación de DNA e histonas. Estas reacciones ejercen un control epigenético fundamental sobre la síntesis de proteínas. Por tanto, los aspectos genéticos del metabolismo del folato son muy variados y pueden tocar eventos tan dispares que van desde la impronta prenatal a la susceptibilidad al cáncer.

En la tabla 3 se recoge una descripción de polimorfismos genéticos relacionados con el transporte, metabolismo de los folatos y con el ciclo de los metilos que van a ser estudiados en este trabajo.

1.6. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS

A la principal función de los estrógenos como hormona implicada en la reproducción femenina se suma su contribución a otros procesos fisiológicos como son el metabolismo de la glucosa, la vía de señalización celular de la insulina, la reparación del tejido vascular, la homeostasis de lípidos y el remodelado óseo. Como hormona esteroidea, el estrógeno, mediante una unión de alta afinidad, activa receptores de localización nuclear. Los receptores de estrógenos (ER) regulan la transcripción de genes sensibles a estrógenos. Su activación regula la expresión genética, afecta a la proliferación celular y la diferenciación de los tejidos diana. Actúan como factores de transcripción activando o inhibiendo la síntesis de ARN mensajeros (RNAm) y como consecuencia se traducen a proteínas implicadas en los

efectos fisiológicos estrogénicos, importantes para el desarrollo de folículos ováricos normales y la fertilidad femenina. En ambos sexos los ERs se expresan en múltiples tejidos entre los que destacan el músculo liso y esquelético, tejido adiposo, hueso y páncreas. Así, estos receptores no sólo están implicados en la función reproductora sino también en el sistema vascular, inmune, nervioso y en la función hepática.

Debido a la diferente prevalencia de ECV entre hombres y mujeres premenopaúsicas y entre pre- y postmenopaúsicas, se ha sugerido que los estrógenos jueguen un papel importante en su etiología. La expresión de ER en tejidos no reproductivos es similar en hombres y mujeres lo que podría elucidar la patogénesis de la ECV. Hay evidencias de que los estrógenos (o la ausencia de éstos) ejercen una función importante en trastornos fisiológicos y metabólicos que incrementan el riesgo de ECV incluyendo la resistencia a la insulina, dislipemia, hipertensión, exceso de acumulación de tejido graso. Por ello, los genes relacionados con las vías de señalización celular de los estrógenos son objeto de estudio dentro del efecto que ejerce la variabilidad genética como factor de riesgo de ECV (Casazza et al., 2010).

Hay 2 subtipos de ER: α y β , codificados por genes diferentes en cromosomas separados. El gen del ER- α (ESR1), considerado el principal receptor en cuanto a la actividad estrogénica, se sitúa en el cromosoma 6q25.1, abarca más de 140 kb y está formado por 8 exones separados por 7 intrones. La unión de los estrógenos a su receptor origina un cambio conformacional que da lugar a la homodimerización del complejo, lo que permite la unión a regiones específicas del genoma de elementos de respuesta a estrógenos y da lugar a la expresión de genes diana relevantes. Además se sabe que este complejo, incluso en ausencia de ligando, puede influir o activar cascadas de señalización celular mediadas por kinasas que resultan en la fosforilación y activación de la óxido nítrico sintasa y otras proteínas ó sistemas enzimáticos relacionados con la función cardiovascular (Herrington, 2003). El principal intermediario implicado en el efecto ateroprotector de los estrógenos es el ER- α (Figtree et al., 2009) de ahí que se hayan estudiado ampliamente las variaciones genéticas del ESR1.

Los polimorfismos genéticos del ESR1 se identificaron hace más de 20 años

poco después de establecer la organización genómica del cromosoma 6. En la última década se han publicado múltiples estudios de asociación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) del ESR1 con varias enfermedades como el cáncer, la osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas, ECV y obesidad (Casazza et al., 2010). Los dos SNPs del ESR1 más estudiados están situados en el primer intrón del gen, a 397 y 351 pares de bases del exón 2 respectivamente, se identifican también por sus endonucleasas de restricción PvuII y XbaI. El SNP del sitio restricción XbaI cambia una A por una G (rs9340799) y en el PvuII implica un cambio de T por C (rs2234693) (ver tabla 3). Debido a su proximidad física están fuertemente asociados y en desequilibrio de ligamiento. Se han detectado al menos 3 haplotipos: AT, GC y AC, pero la frecuencia de algunos es muy baja (del AC), lo que indica que el desequilibrio no es completo ó que han tenido lugar múltiples cambios en la región del haplotipo que contiene estos dos sitios polimórficos (Gallagher et al., 2007; Koch et al., 2005; Lawlor et al. 2006). Los estudios de asociación de estos haplotipos con factores de riesgo de ECV no han concluido cuales deberían usarse. Respecto al efecto que tienen estos SNPs, se ha comprobado in vitro que el alelo C del rs2234693 produce un aumento en la transcripción génica y el cambio por una G del rs9340799 produce algo similar por lo que tendría un efecto en la expresión de genes y sus mecanismos moleculares. Una señalización de los ER- α menos efectiva puede influir indirectamente en una actividad reducida de los estrógenos sobre sus tejidos diana. En caso de los factores de riesgo de ECV afectaría en las vías de comodulación de factores clave como el receptor de insulina, el factor de crecimiento tipo insulina y el receptor de proliferación activado de peroxisomas.

De los estudios de asociación llevados a cabo entre los dos SNPs y factores de riesgo de ECV (índice de masa corporal, respuesta a la insulina, adiposidad, niveles de lípidos) revisados en el trabajo de Casazza y colaboradores (Casazza et al., 2010), podemos deducir la necesidad de estratificar las poblaciones de estudio por sexo y edad a la hora de valorar los efectos en ECV. En el caso de estos polimorfismos, sería fundamental, dado que no sólo tener un alelo u otro puede estar más o menos relacionado con el riesgo de ECV sino también la condición de ser hombre o mujer,

derivaría en un efecto u otro en función de los niveles de estrógenos circulantes; que son los que al fin y al cabo activan el ER- α .

Gen	Nombre	Enzima	Locus	Función	Polimorfismo	Variación alélica	Cambios en la proteína	Efecto	Referencia
ABCB1	<i>ATP-binding cassette transporter</i> subfamilia B, miembro 1	-	7q21.12	Transportador de membrana celular acoplado ATP de xenobióticos	rs1045642 c.3435C>T	C>T	Codon sinónimo	Mayor/menor expresión del gen, resultados contradictorios según población estudiada	(Wolking et al., 2015)
ATIC	5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotido formiltransferasa/IMP hidrolasa	EC 2.1.2.3	2q35	Cataliza los dos últimos pasos de la síntesis de novo de purinas: transformilasa-ciclohidrolasa	rs2372536 c.347C>G	C>G	Thr116Ser	Modula el efecto catalítico del enzima por un mecanismo desconocido aumentando precursores de las purinas.	(Dervieux et al., 2004)
BHMT	Betaina-Homocisteína-metiltransferasa	EC 2.1.1.5	5q14.1	Conversión de betaina Hcy y de dimetilglicina a Met	rs3733890 c.716G>A	G>A	Arg239Gln	Relacionado con DTN, incremento de Hcy normalizada por folato, enzima menos eficiente	(Li et al., 2008)
CBS	Cistationina-β-sintasa	EC 4.2.1.22	21q22.3	Transulfuración: conjugación de Hcy y Ser a Cistationina que se convierte en Cys y alfa cetobutirato, emplea B6	rs5742905 c.833T>C cbs844ins68	T>C SL	Ile278Thr Codón de terminación prematuro	Mejor funcionamiento de la enzima en paciente con homostinuria repondedores a piridoxina Enzima no funcionante	(Shih et al., 1995) (Sebastio et al., 1995)
DHFR	Dihidrofolato-reductasa	EC 1.5.1.3	5q14.1	Convierte DHF en THF	19pb del	Expresión del gen	Cambios en mRNA	Bibliografía contradictoria de mayor vs menor expresión del enzima	(Kalmbach et al., 2008)
ESR1	Receptor de estrógenos alfa 1		6q24-q27	Receptor hormonal nuclear	rs9340799 XbaI c.453-351A>G rs2234693 PvuII c.453-397T>C	A>G T>C		Menor expresión del receptor en haplotipo AT	(Sunderman et al., 2010)

Tabla 3 (I): Selección de polimorfismos genéticos relacionados con el transporte, metabolismo de los folatos y ciclo de los metilos y del receptor de estrógenos ESR1

Gen	Nombre	Enzima	Locus	Función	Polimorfismo	Variación alélica	Cambios en la proteína	Efecto	Referencia
MTHFD1	Metilentetrahydro-folato deshidrogenasa-ciclohidrolasa-formiltetrahydrofolatosintetasa-NADPH	EC 1.5.1.5-EC 3.5.4.9-EC 6.3.4.3	14q24	Proteína trifuncional: 5,10-metilenTHF deshidrogenasa, 5,10-metilenTHF ciclohidrolasa, 10 formilTHF sintetasa. Reacciones secuenciales de la interconversion de formas monocarbonados de folatos	rs2236225 c.1958G>A	G>A	Arg653Gln	Menor actividad sintetasa	(Hol et al., 1998)
MTHFR	5,10-metilentetrahydro-folato-reductasa (MTHFR)	EC 1.5.1.20	1p36.22	Conversión de 5-10metilenTHF a 5- metilTHF, cosustrato para la remetilación de Hcy a Met	rs1801131 c.1286A>C (A1298C) rs1801133 c.665C>T (C677T)	A>C C>T	Glu429Ala Ala222Val	Menor actividad enzimática en homocigosis Enzima termolábil con menor actividad-> HiperHcy.	(van der Put et al., 1998) (Goyette et al., 1994)
MTR	5Metiltetrahydrofolato-homocisteína metiltransferasa /Metionina Sintasa (MTR)	EC 2.1.1.13	1q43	Remetilación de Hcy a Met. Coenzima B ₁₂ (cobalamina I)	rs1805087 c.2753A>G	A>G	Asp919Gly	Cambio conformacional en la estructura secundaria de la proteína	(Van Der Put et al., 1997)
MTRR	5 Metil tetrahydrofolato-homocisteína metiltransferasa reductasa/MTR reductasa	EC 1.16.1.8	5p15.31	Reduce el cofactor de la MTR (cobalamina II a cobalamina I) para que la MTR sea funcional	rs1801394 c.66A>G	A>G	Ile22Met	Menor unión a la MTR de la enzima variante , afecta la actividad de MTR	(Olteanu et al., 2002)
SLC19A1 (RFC1)	Transportador soluble, familia 19, miembro 1 / Transportador de folato reducido	-	21q22.3	Proteína soluble transportadora de folatos. Regula la concentración intracelular de folatos	rs1051266 c.80A>G	A>G	His27Arg	Transportador menos eficaz	(Chango et al., 2000)

Tabla 3 (II) Selección de polimorfismos genéticos relacionados con el transporte, metabolismo de los folatos y ciclo de los metilos y del receptor de estrógenos ESR1

Gen	Nombre	Enzima	Locus	Función	Polimorfismo	Variación alélica	Cambios en la proteína	Efecto	Referencia
SHMT1	Serina-hidroximetil transferasa (citoplasmática)	EC 2.1.2.1	17p11.2	Conversión de Serina y THF a Glicina y 5,10-metilenTHF	rs1979276	A>G	Región 3'UTR	-	(Wang et al., 2007)
					rs1979277	C>T	Leu474Phe	Proteína modificada se acumula en citoplasma	
					rs643333	C>A	Región promotora	-	
					rs638416	C>G	Región promotora	-	
					rs3783	C>G	Región 3'UTR	-	
TCN2	Transcobalamina 2	-	22q12.2	Globulina transportadora de Vitamina B12	rs9606756	A>G	Ile23Va	Cambios en afinidad de la proteína por B ₁₂	(Miller et al. 2002)
					rs1801198	C>G	Pro259Arg	Cambios en afinidad de la proteína por B ₁₂	(Miller et al. 2002)
					c.776G>A			RNAm inestable del alelo con la deleción lo que desciende niveles de TYMS	(Kawakami et al., 1999)
TYMS	Timidilato sintasa	EC 2.1.1.45	18p11.32	Síntesis de dTMP a partir de dUMP y 5,10-metilenTHF	rs34489327	D/I deleción de 6bp	Región 3'UTR	Cambios en afinidad de la proteína por B ₁₂	(Miller et al. 2002)
								RNAm inestable del alelo con la deleción lo que desciende niveles de TYMS	(Kawakami et al., 1999)
					rs34743033	2R/3R 28bp VNTR	Región 5'UTR	Incremento de la transcripción de la enzima	(Kawakami et al., 2001)
			rs2853542	C>G del VNTR 3RC/3RG	Región 5'UTR	Desciende niveles de TYMS	(M.V. Mandola et al., 2003)		

Tabla3 (III): Selección de polimorfismos genéticos relacionados con el transporte, metabolismo de los folatos y ciclo de los metilos y del receptor de estrógenos ESR1

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2.1. HIPÓTESIS

Existe un dimorfismo sexual, de componente hormonal, del eje folatos-Hcy-Met, que se puede evidenciar por la respuesta a un tratamiento en dosis media-alta con ácido folínico y que está mediado por polimorfismos genéticos de genes asociados a hormonas sexuales y al metabolismo y distribución de los folatos en el ser humano

2.2. OBJETIVOS

- 1) Efecto del tratamiento con ácido folínico en folato intraeritrocitario, folato sérico, Hcy, y vitamina B₁₂, en una población sana, joven y homogénea en edad, y su evolución en el tiempo (estimación basal inicial, durante el tratamiento y un mes después)
- 2) Efecto diferencial, en función del sexo, del tratamiento con ácido folínico, sobre las variaciones de los niveles de Hcy, fólico sérico, fólico intraeritrocitario y vitamina B₁₂.
- 3) Variación de la evolución, en una población dividida por sexos, de los niveles de Hcy, del fólico sérico, fólico intraeritrocitario y vitamina B₁₂, en función de polimorfismos genéticos seleccionados del metabolismo y distribución de los folatos y hormonas sexuales.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3. MATERIAL Y MÉTODOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3.1. SUJETOS DE ESTUDIO

Los sujetos de este estudio fueron reclutados entre estudiantes universitarios cuyas edades estaban comprendidas entre los 18 y los 25 años que fueron invitados a participar en dicho estudio de forma voluntaria. Tras obtener la aprobación del comité de Ética de la Universidad, informamos a todos los participantes de los objetivos del estudio y solicitamos su consentimiento informado por escrito para la obtención de muestras de sangre. La investigación de este estudio se realizó conforme a los principios señalados en la declaración de Helsinki (*World Medical Association, 2004*)

3.1.1. Criterios de exclusión

Fueron rechazados del estudio todos los sujetos que demostraron haber padecido enfermedades hepáticas, renales, gastrointestinales y cardiovasculares, así como los que informaron de haber recibido tratamiento en los tres meses anteriores al estudio con folatos, vitamina B₁₂ y B₆, complejos multivitamínicos, anticonvulsivantes, antipalúdicos o anticonceptivos orales.

3.1.2 Criterios de inclusión

En cumplimiento de los criterios básicos de exclusión, fueron elegidos 25 sujetos de sexo masculino y 31 de sexo femenino para participar en el estudio. Después del reclutamiento 2 hombres y 5 mujeres fueron excluidos por no incorporarse al programa de extracción de sangre, en algún momento del estudio.

3.2. TRATAMIENTO

El tratamiento consistió en la administración oral de 5 mg/día de ácido levofolinato cálcico (Isovorin®, Pfizer, Nueva York, EE.UU.) durante 30 días. Elegimos el ácido levofolínico ó 5-formilTHF (su sal cálcica, levofolinato cálcico) en base a que la

mayoría de las formas de folato medidas en sangre, a diferencia del ácido fólico, se convierten en la forma 5-metilTHF.

3.3. TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena antecubital entre las 8:30 y 9:30 a.m. horas tras el ayuno nocturno. Se realizaron extracciones dos días antes del comienzo del periodo de intervención (día 0) y los días 2, 5, 10 y 30 durante el tratamiento y a los 30 días (día 60) de haber finalizado el tratamiento.

3.4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

3.4.1. Determinación de Homocisteína plasmática

La Hcy plasmática se determinó a los sujetos en ayunas, a partir de muestras de sangre recogidas en tubos con EDTA. La separación del plasma se hizo en frío en los primeros 20 minutos desde su extracción y tras centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 4 °C. El plasma fue congelado a -80 °C hasta el análisis.

La determinación cuantitativa de Hcy se llevó a cabo mediante inmunonefelometría en el autoanalizador BNII® (Siemens, Deerfield,USA). Se trata de un ensayo competitivo en el que la Hcy ligada presente en la muestra se reduce a Hcy libre por la acción del ditiotreitól, y se convierte enzimáticamente en S-adenosilhomocisteína (SAH) en la siguiente fase. La S-adenosilcisteína conjugada (SAC), añadida al comienzo de la reacción, compite con la SAH de la muestra por la unión a anticuerpos anti-SAH unidos a partículas de poliestireno. En presencia de SAH, o no hay agregación o se produce una agregación de partículas muy débil. En ausencia de SAH en la muestra, se produce una agregación de las partículas de poliestireno por la SAC conjugada. Cuanto mayor sea el contenido de SAH de la mezcla de reacción,

menor será la señal de luz dispersada. El resultado se evalúa en comparación con un estándar de concentración conocida siendo el rango de medición de la técnica de 2,0 - 64 $\mu\text{mol/L}$.

3.4.2. Determinación de Vitamina B₁₂ y Folatos

Las muestras para la determinación de vitamina B₁₂ y folatos séricos fueron recogidas en tubos sin anticoagulante situadas en hielo y centrifugadas en los primeros 20 minutos tras su extracción a 3000 X g durante 10 minutos a 4º C. El suero fue separado y posteriormente congelado a -80 ºC hasta su análisis.

Para la determinación de folato intraeritrocitario se recogió sangre en tubos con EDTA y se lisaron las células mediante una dilución 1:20 con ácido ascórbico al 1% (100 μL de sangre total en 2 mL de solución de ácido ascórbico). Se mezcló en vórtex durante 10 s y se congeló inmediatamente a -80 ºC. Todo el proceso así como el almacenamiento se realizó protegido de la luz, en tubos ámbar.

Tanto la determinación de vitamina B₁₂ como los folatos se realizaron mediante un equipo comercial de radioinmunoensayo (RIA) simultáneo con separación en fase sólida sin ebullición (Solid Phase No Boil Dualcount[®], DPC, Los Angeles, CA, USA), basado en el método de Chen (Chen et al., 1982). En resumen, se realizaron dos RIAs competitivos en un mismo tubo, usando dos moléculas marcadas con diferentes isótopos, el ⁵⁷Co vitamina B₁₂ y el ¹²⁵I ácido fólico

3.5. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS

El análisis molecular de los polimorfismos genéticos estudiados se llevó a cabo a partir del ADN genómico extraído de sangre periférica de los sujetos siguiendo el método de precipitación salina descrito por Martínez et al. (Martínez et al., 1998)

Los 24 polimorfismos genéticos estudiados se agruparon en tres reacciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex: dos para polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*) y un tercer grupo de polimorfismos del tipo deleciones, inserciones, repeticiones en tándem (Tabla 4)

MULTIPLEX 1 (SNPs)		MULTIPLEX 2 (SNPs)		MULTIPLEX 3 (Inserciones, deleciones, repeticiones en tándem)	
Gen	Polimorfismo	Gen	Polimorfismo	Gen	Polimorfismo
	rs1979276	MTHFR	rs1801131	DHFR	19-pb inserción /delección
	rs1979277		rs1801133		
SHMT	rs643333	MTR	rs1805087	TYMS	rs34489327 rs34743033
	rs638416				
	rs3783				
BHMT	rs3733890	ESR1	rs9340799	CBS	cbs844ins68
			rs2234693		
ATIC	rs2372536	ABCB1	rs1045642		
RFC1	rs1051266	CBS	rs5742905		
MTRR	rs1801394	TCN2	rs1801198		
MTHFD1	rs2236225				
TCN2	rs9606756				
TYMS	rs2853542				

Tabla 4. Agrupación en multiplex de los Polimorfismos genéticos seleccionados

3.5.1. SNPs

El genotipado de SNPs se llevó a cabo en dos reacciones de mini-secuenciación (del inglés *minisequencing*) precedidas por dos PCR multiplex de las regiones adyacentes. El método fue descrito por Carvalho and Pena en 2005 (Carvalho y Pena, 2005). Es una reacción similar a la de secuenciación por el método Sanger, con la diferencia de que utiliza entre sus reactivos únicamente dideoxinucleótidos marcados con una molécula fluorescente (ddNTP*s) unidos a fluorocromos de 4 colores distintos

en función de la base. La mini-secuenciación consiste en la utilización de un cebador (ó *primer*) que hibrida con la secuencia inmediatamente adyacente a la posición donde se encuentra el SNP. Se utiliza un cebador por cada SNP a estudio diseñado en un sentido ó en otro. El cebador se ancla al amplificado anterior y cuando actúa la polimerasa incorpora un ddNTP*. Mediante el empleo de didesoxinucleótidos marcados con una molécula fluorescente y una DNA polimerasa, se añade el nucleótido marcado complementario al sitio donde se halla el SNP. Cada ddNTP (ddGTP, ddATP, ddCTP y ddTTP) está marcado con un fluorocromo (*). La reacción de mini-secuenciación se realiza en todos los SNPs de la multiplex a la vez. A continuación, mediante electroforesis capilar se separa cada SNP por tamaño y se identifica según la señal de fluorescencia en cada secuencia amplificada tal y cómo se ha incorporado en la mini-secuenciación (Figura 12)

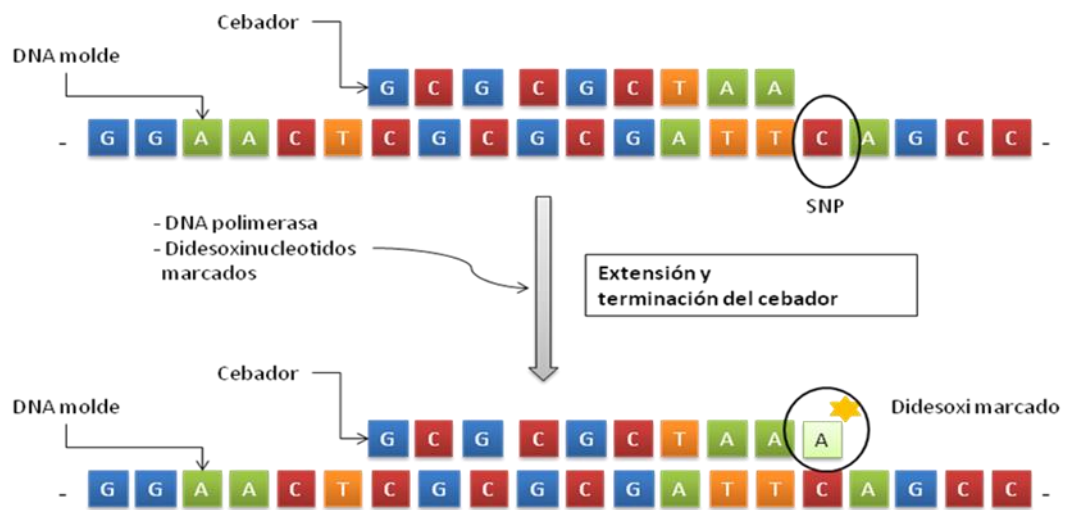


Figura 12. Reacción de minisequenciación

Para el diseño de los cebadores empleamos el software Oligo®7 4.0 (*Molecular Biology Insights*, Cascade, CO, EE.UU.). Las secuencias de las sondas se muestran en las tablas 5 y 6. Para verificar la validez y fiabilidad de la técnica se analizó cada polimorfismo en una única reacción antes de agruparlas.

Nombre del Gen	dbSNP	Localización	Alelo1	Alelo2	Cebadores de las secuencias flanqueantes del SNP	Secuencia del cebador de la reacción de minisequenciación	Orientación del cebador en la minisequenciación
Multiplex1							
SHMT1	rs1979276	17p11.3	A	G	F:CTGGCAGGGGATAAGTACCAG R:GTCAACAGTTCCCTTTGGA	CCGGAGGACCCCCAC	Forward
	rs1979277		A	G		(T)31*-GCCAGGCAGAGGGAAGA	Reverse
	rs643333		A	C		(T)24*-ACCTGCAGAACTGACCC	Reverse
	rs638416		C	G		(T)91*-GCAGGGCCTGTTTCTCC	Reverse
	rs3783		C	G		(T)115*-GGGGTCCTCCGGCAG	Reverse
TYMS	rs2853542	18p11.32	C	G	F:GTGCCACACCCGTGGCTCC R:GCCACAGGCATGGCGCGG	(T)84*-GGGACGGAGGCAGGC	Reverse
TCN2	rs9606756	22q11.2	A	G	F:GGAGAAGGCCCTGGTAACG R:CTTCCTTGGTCCCAGCCTG	(T)64*-GGCTGTCCATCTCTGGTA	Reverse
ATIC	rs2372536	2q35	C	G	F:CCTAGATAGCTGTAAACCAC R:GTAATCCCAAAACACAATC	(T)18*-CCACAGCCTCCTCAACA	Reverse
BHMT	rs3733890	5q13.1-q13.2	A	G	F:TGTGAACTGCCACTTTGACC R:ATGGGAATTCTGGGAGATCG	ATCAGGTGAGCTTTCAGT	Reverse
MTHFD1	rs2236225	14q24	C	T	F:CCCACTTTGAAGCAGGATTG R:CATCCCAATTCCCCTGATG	(T)59*-AACAAGCTTGAGTGCGATC	Reverse
MTRR	rs1801394	5p15.3-p15.2	A	G	F:TTCAGTTTCACTGTTACATGC R:GTAACGGCTCTAACCTTATCG	(T)51*-ACCACAGCTTGCTCACA	Reverse
RFC1	rs1051266	21q22.3	A	G	F:TTCCAGGCACAGTGTCACC R:CCGCGTGAAGTTCTTGTCTG	(T)40*-CCGGTCCTGGCGGC	Forward

*Cola de poliT en el extremo 5' de cada cebador de SNP

Tabla 5. Secuencias de cebadores de la Multiplex 1 (F= forward primer; R= reverse primer ; PCR= polymerase chain reaction; dbSNP =database SNP)

Nombre del Gen	dbSNP	Localización	Alelo1	Alelo2	Cebadores de las secuencias flanqueantes del SNP	Secuencia del cebador de la reacción de minisequenciación	Orientación del cebador en la minisequenciación
Multiplex2							
MTHFR	rs1801131	1p36.22	A	C	F: CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC R: CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG	(T)71*-AGGAGCTGACCAGTGAAG	Forward
	rs1801133		C	T	F: GTGGTCTCTTCATCCCTCG R: GACGGTGCGGTGAGAGTG	GAAGGTGTCTGCGGGAG	Forward
CBS	rs5742905	21q22.3	C	T	R: CTCGGTCTGGTTCAGCTCC	(T)42*-GCGCCCTCTGCAGATCA	Forward
ABCB1	rs1045642	7q21.12	C	T	F: GCTGAGAACATTGCCTATGG R: TAAGGGTGTGATTTGGTTGC	(T)34*-GGTGTACAGGAAGAGAT	Forward
MTR	rs12749581	1q43	A	G	F: GCATTGACCATTACTACACC R: TCCAAAGCCTTTTACTACTCC	AATATGAAGATATTAGACAGG	Forward
TCN2	rs1801198	22q12.2	C	G	F: GGGAAAGAGACCCTGGAGC R: GCTGGGAAATCATGAGAGC	(T)58*-CCCAGTTCTGCCCA	Forward

*Cola de poliT en el extremo 5' de cada primer de SNP

Tabla 6. Secuencias de cebadores de la Multiplex 2. (F= forward primer; R= reverse primer ; PCR= polymerase chain reaction; dbSNP =database SNP)

Las reacciones multiplex de PCR se realizaron en 10 μ L de volumen con:

- 100 ng de ADN genómico,
- 1XAmplitaq® Buffer(Applied Biosystems),
- $MgCl_2$ 1.5mM,
- dNTPs 0.2mM,
- 1 unidad de Amplitaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems)
- 3 μ L de la mezcla de cebadores (con concentraciones comprendidas entre 0.1 y 0.6 μ M).

Para la amplificación utilizamos un 2720 Thermal Cycler®(Applied Biosystems) y el ensayo consistió en una desnaturalización de 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 58°C, 30s a 72°C y la extensión final en 7 min a 72°C. El exceso de cebadores y dNTPs se retiraron del producto de PCR mediante digestión con 2 unidades de exonucleasa I de E. coli (Exo I®, Takara) que degrada únicamente DNA monocatenario y 5 unidades de fosfatasa alcalina (CiAP®, Takara) que degrada los dNTPs incubando la mezcla a 37°C durante 60 min. A continuación y mediante calor (80°C, 20 min) se inactivaron ambas enzimas.

Las reacciones multiplex de minisequenciación se realizaron en un volumen final de 11 μ L con:

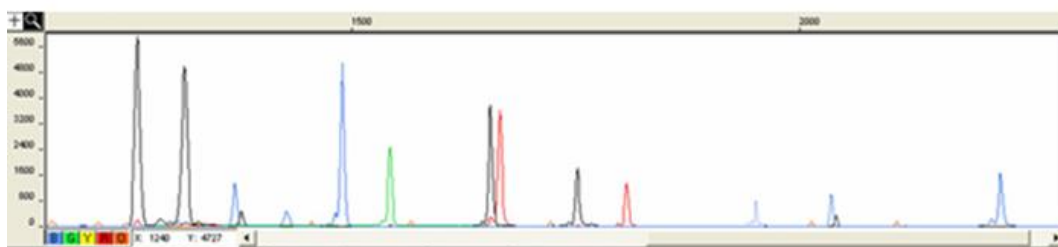
- 4 μ L del producto de PCR purificado
- 6 μ L de la mezcla de cebadores de minisequenciación (2 pM/ μ L)
- 1 μ L del kit SNaPshot® (Applied Biosystems)

Las condiciones de minisequenciación fueron: 40 ciclos a 96°C-10s, 50°C-7s, 60°C-30s. Previa a la electroforesis capilar, es necesario eliminar los ddNTP*s que no se han unido al amplificado, para que no interfieran en la señal. Es lo que denominamos “purificar” la muestra con 1 unidad de fosfatasa alcalina (CiAP®, Takara) a 37°C, 1h e inactivamos la enzima a 80°C durante 20 min.

Para llevar a cabo la electroforesis capilar utilizamos 4 μL del producto de minisequenciación purificado mezclado con 10 μL de formamida HiDi™ y 0.2 μL de estándar de tamaño GeneScan™120 LIZ® (Applied Biosystems) y desnaturalizamos a 95°C durante 5 min. Los productos marcados con fluorescencia se resolvieron por electroforesis capilar en un Abi Prism® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durante 17 min con una inyección de 8s.

Finalmente, la interpretación de los electroferogramas (ver figura 13) se llevó a cabo con ayuda del software GeneMapper™ 4.0 (Applied Biosystems).

a. Multiplex 1



b. Multiplex 2

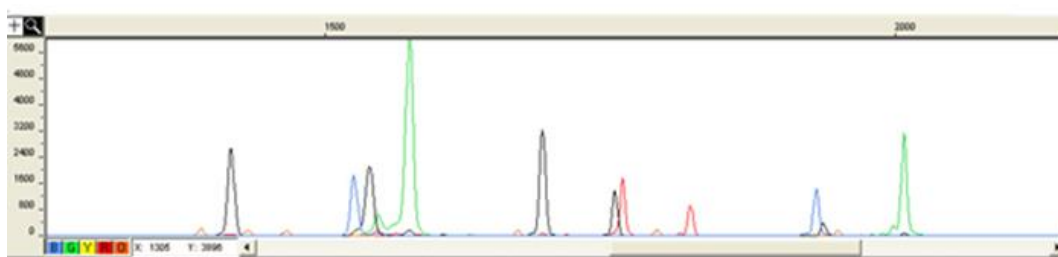


Figura 13: Visualización de los electroferogramas de las dos multiplex de minisequenciación de SNPs en GeneMapper™ 4.0 (Applied Biosystems).

3.5.2. Otros polimorfismos

Para determinar otros polimorfismos diferentes de los SNPs (deleciones, inserciones, repeticiones en tándem) se llevó a cabo una PCR multiplex con las siguientes condiciones experimentales, en un volumen final de 10 μ L:

- 100 ng de ADN genómico,
- 1X GoTaq® FlexiBuffer (Promega),,
- MgCl₂ 1.5mM,
- dNTPs 0.2mM,
- 1 unidad of Go Taq® Flexi DNA Polymerase (Promega)
- Betaína 50mM
- 3 μ L de la mezcla de cebadores marcados (con concentraciones comprendidas entre 0.1 y 0.6 μ M).

En la tabla 7 se muestran las secuencias de los cebadores marcados incluidos en la multiplex 3

Multiplex3						
Nombre del Gen	dbSNP	Localización	Alelo1	Alelo2	Forward	Reverse
TYMS	rs34489327	3'-UTR	I	D	PET- CAAATCTGAGGGGAGCTGAGT	CAGATAAGTGCCAGTACAGA
	rs34743033	5'-UTR	2R	3R	VIC- GTGCCACACCCGTGGCTCC	GCCACAGGCATGGCGCGG
CBS	cbs844ins68	INTR/EXON	S	L	6FAM- GTTGTTAACGGCGGTATTGG	GTTGTCTGCTCCGTCTGGTT
DHFR	DHFR19bpdel	INTRON	+	-	ACGGTCGGGGTGGCCGACTC	6FAM- AAAAGGGGAATCCAGTCGG

Tabla 7. Secuencias de cebadores de la Multiplex 3. (F= forward primer; R= reverse primer; PCR= polymerase chain reaction; dbSNP =database SNP)

Para la amplificación utilizamos un 2720 Thermal Cycler®(Applied Biosystems) y el ensayo consistió en una desnaturalización de 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 30s a 94°C, 45s a 58°C, 1 min a 72°C y la extensión final en 7 min a 72°C. Finalizada la PCR realizamos la electroforesis capilar del producto mezclando 4 µL con 10 µL formamida HiDi™ y 0.2 µL de estándar de tamaño GeneScan™600 LIZ® (Applied Biosystems) y desnaturalizamos a 95°C durante 5 min. Los productos marcados con fluorescencia se resolvieron por electroforesis capilar en un Abi Prism® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durante 45 min con una inyección de 5s por muestra. Para la discriminación alélica de estos polimorfismos analizamos los electroferogramas con el software GeneMapper™ 4.0 (Applied Biosystems), ver figura 14.

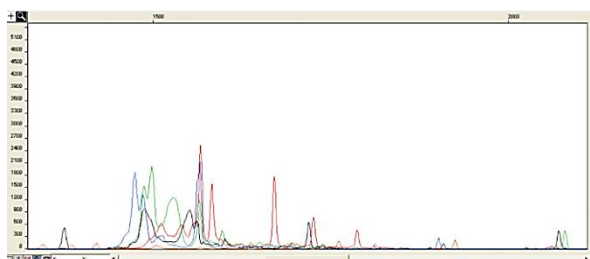


Figura 14: Visualización de un electroferograma de las multiplex 3 de otros polimorfismos en GeneMapper™ 4.0 (Applied Biosystems).

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

3.6.1. Estudio de las variables bioquímicas

Debido a la variabilidad interindividual de los datos bioquímicos se optó por expresar la variación porcentual de cada parámetro respecto a su nivel basal en los distintos días de tratamiento en lugar de sus valores absolutos.

El análisis de la correlación entre los parámetros bioquímicos se llevó a cabo mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman no paramétrico, teniendo en cuenta el valor de r como significativa cuando $p < 0,05$. El análisis

estadístico de las variables de regresión se llevó a cabo utilizando el método de mínimos cuadrados.

Para detectar las diferencias significativas entre hombres y mujeres durante el tratamiento se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) con la corrección posterior a la prueba de Bonferroni . Todos los valores de p a dos colas y la significación estadística se definió como $p < 0,05$.

Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism 6®

3.6.2. Análisis estadístico de los genotipos

Para el tratamiento estadístico de los genotipos en primer lugar verificó el cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante un análisis de frecuencia χ^2 . El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. En condiciones habituales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren fenómenos distorsionadores, como la aparición frecuente de nuevas mutaciones o la selección de alelos, la probabilidad de observar una combinación de alelos concreta (un genotipo) depende del producto de las probabilidades (frecuencias) de cada alelo. Dicho equilibrio establece que en una población las frecuencias relativas de cada uno de los tres genotipos de un polimorfismo (homocigóticos salvajes, heterocigóticos y homocigóticos mutados) deben permanecer constantes y seguir un modelo de distribución estadística. Es decir, las frecuencias de los genotipos de un locus individual se fijarán en un valor de equilibrio particular. Estas frecuencias de equilibrio se pueden representar como una función sencilla de las frecuencias alélicas en ese locus. En el caso más sencillo, con un locus con dos alelos A y a , con frecuencias alélicas de p y q respectivamente, el equilibrio de Hardy-Weinberg predice que la frecuencia genotípica para el homocigoto salvaje AA es p^2 , la del heterocigoto Aa es $2pq$ y la del homocigoto mutado aa , es q^2 . El

principio de Hardy-Weinberg es una expresión de la noción de una población que está en "equilibrio genético", y es un principio básico de la genética de poblaciones.

Para realizar la asociación entre los genotipos de los polimorfismos estudiados y las variables de respuesta (parámetros bioquímicos) previamente elegimos un modelo de genotipo (codominante, dominante, recesivo...). Según el modelo dominante comparamos la respuesta de los individuos que tiene uno ó dos alelos variantes frente a los que tiene el genotipo salvaje. El modelo recesivo compara los homocigotos mutados frente a los que no tienen el alelo variante junto con los heterocigotos. La elección del modelo de comparación estuvo determinada por el modelo que presentara menor valor del criterio de información de Akaike (AIC):

$$AIC = -2\log[L] + \#\text{parámetros},$$

donde L es la verosimilitud del modelo. Este criterio pondera el ajuste del modelo ($-2\log L$) con la complejidad (número de parámetros) (Iniesta et al., 2005)

En los polimorfismos estudiados en un mismo gen que ha sido conjuntamente estudiados en diversos trabajos, los del ESR1 y MTHFR, (Ogino and Wilson, 2003; Deroo and Korach, 2006) se llevó a cabo un análisis de los haplotipos. Para el análisis de frecuencias haplotípicas se empleó el método de estimación estadística mediante el algoritmo esperanza-maximización (EM). Este algoritmo itera repetidamente entre 2 pasos hasta conseguir convergencia. En primer lugar, se usan unas frecuencias iniciales, no necesariamente correctas, para cada posible haplotipo. En el supuesto de que esas frecuencias fuesen correctas, y asumiendo que hay equilibrio de Hardy-Weinberg, se podría calcular la frecuencia esperada de cada combinación de genotipos con incertidumbre (paso E). Con las frecuencias de cada combinación de genotipos se pueden obtener las frecuencias de cada haplotipo maximizando la función de verosimilitud de los haplotipos (paso M). Este paso consiste en contar los haplotipos compatibles con cada combinación de genotipos. El algoritmo converge a valores estables de frecuencia de combinaciones de genotipos con incertidumbre y de

frecuencia de haplotipos, que es nuestro objetivo. Para los individuos con incertidumbre, a cada pareja de haplotipos posible se le puede calcular una probabilidad.

El desequilibrio de ligamiento (*Linkage disequilibrium*, LD) se refiere a la asociación ente alelos de diferentes loci en uno de los cromosomas homólogos (haplotipos). LD hace referencia a la disposición no casual de alelos en dos loci, de modo que estos alelos serán heredados conjuntamente a lo largo de múltiples generaciones. Para determinar el LD empleamos el estadístico D, que es la desviación entre la frecuencia esperada del haplotipo (bajo el supuesto de no asociación) y la frecuencia observada. Si p_1 y p_2 son las probabilidades de cada alelo y p_{12} la probabilidad de la pareja, D sería:

$$D=p_{12}-p_1p_2$$

Calculamos además el estadístico D', que es el mismo D escalado en un rango (-1,1) y el coeficiente de correlación entre los alelos (r), así como su nivel de significación (p).

En el análisis estadístico de los genotipos se utilizó el programa SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>)

3.6.3. Análisis estadístico de los parámetros bioquímicos durante el tratamiento según genotipo y sexo

Para el estudio de las variaciones porcentuales respecto del nivel basal de los parámetros bioquímicos durante el tratamiento en función del genotipo de cada polimorfismo estudiado (siguiendo el modelo definido dominante ó recesivo) en cada sexo se utilizó el análisis de la varianza con la corrección posterior a la prueba de Bonferroni . Todos los valores de p fueron calculados a dos colas y la significación estadística se definió como $p < 0,05$.

Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism 6®

3.6.4. Análisis de asociación entre haplotipos del ESR1 de los parámetros bioquímicos durante el tratamiento

Para evaluar la posible asociación haplotípica de los SNPs estudiados del ESR1 se empleó un modelo de regresión logística. Calculamos el riesgo relativo (odds ratio) de los diferentes haplotipos y el intervalo de confianza de la variación porcentual de los parámetros bioquímicos en los diferentes días de tratamiento

Este análisis se llevó a cabo mediante el programa estadístico SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snstats>)

3.6.5. Análisis de asociación del número de mutaciones de los SNPs de la MTHFR y los parámetros bioquímicos

Para llevar a cabo este análisis en primer lugar agrupamos los individuos por sexos en función de los genotipos dobles de los dos SNPs de la MTHFR según fueran portadores de 0, 1 ó 2 mutaciones. Para evaluar la posible asociación entre el número de mutaciones en este gen y la respuesta al tratamiento como variación porcentual de los parámetros bioquímicos respecto del nivel basal se utilizó el análisis de la varianza con la corrección post test de Bonferroni. Todos los valores de p fueron calculados a dos colas y la significación estadística se definió como $p < 0,05$.

Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism 6®



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



4. RESULTADOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4.1. FOLATO INTRAERITROCITARIO

4.1.1. Estadística descriptiva de niveles de folato intraeritrocitario

Las concentraciones de folato intraeritrocitario determinadas en nuestro grupo de estudio en el momento basal, a los 2, 5, 10 y 30 días del tratamiento así como al mes de haberlo iniciado se representan en la tabla 9. Las concentraciones ascienden progresivamente hasta el último día en el que se administra el ácido fólico y descienden al mes de finalizado el tratamiento (día 60).

Días de intervención	Total			Hombres			Mujeres		
	Media (nmol/L)	DE (nmol/L)	n	Media (nmol/L)	DE (nmol/L)	n	Media (nmol/L)	DE (nmol/L)	n
0	671,75	220,76	48	631,69	137,59	21	702,91	266,90	27
2	1168,05	476,97	48	1156,42	471,46	21	1177,10	489,97	27
5	1820,86	473,74	44	1673,47	404,91	20	1943,69	499,51	24
10	2334,35	561,53	40	2149,26	488,01	18	2485,78	582,58	22
30	3425,60	870,30	44	2915,16	582,13	17	3746,99	875,49	27
60	1714,08	544,44	28	1535,51	413,34	8	1785,51	582,65	20

Tabla 9: Concentraciones de Folato intraeritrocitario en el grupo de estudio y según el sexo

4.1.2. Estadística inferencial de folato intraeritrocitario

Con objeto de restar el efecto de los niveles basales (variable no controlada), a partir del día 2 de tratamiento, calculamos la variación en porcentaje del ascenso de folato intraeritrocitario respecto al día 0. En el segundo día de tratamiento se detectan 7 sujetos en los que no hubo incremento del folato intraeritrocitario. En los días sucesivos observamos variaciones positivas respecto del nivel basal (Figura 14).

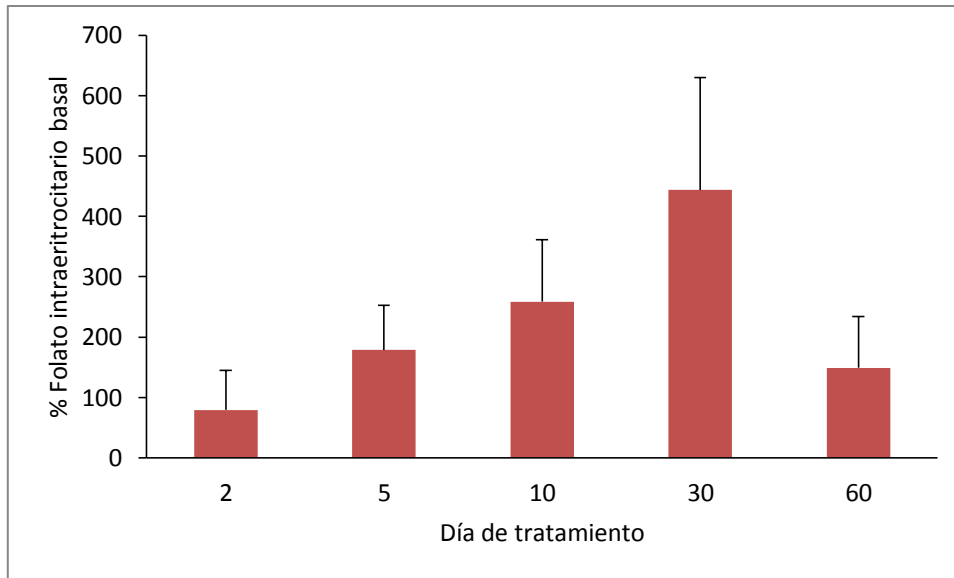


Figura 14. Variación porcentual de folato intraeritrocitario respecto del nivel basal en la población total

La comparación del porcentaje de aumento de folato intraeritrocitario respecto del nivel basal no mostró diferencias estadísticamente significativas entre sexos hasta el día 30, en el que las mujeres alcanzaron mayor variación porcentual respecto de nivel basal de folato intraeritrocitario que los hombres (ver tabla 10).

Días de intervención	Hombres (Media ± DE%)	Mujeres (Media ± DE%)	Diferencia	IC 95%	t	p
2	78,24±66,20	80,21±66,00	-1,968	-82,02 - 85,96	0,06	> 0,05
5	169,60±72,07	186,85±76,90	-17,25	-70,26 - 104,8	0,51	> 0,05
10	253,96±100,55	262,50±107,26	-8,544	-83,26 - 100,3	0,24	> 0,05
30	384,22±155,79	485,16±196,81	-100,9	12,03 - 189,8	2,95	< 0,05*
60	117,11±65,11	161,89±89,67	-44,78	-76,51 - 166,1	0,96	> 0,05

Tabla 10: Comparación por día de tratamiento entre hombres y mujeres del porcentaje de folato intraeritrocitario respecto del nivel basal.

4.2. FOLATO SÉRICO

4.2.1. Estadística descriptiva de niveles de folato sérico

Las concentraciones de folato sérico determinadas en nuestro grupo de estudio en el momento basal, a los 2, 5, 10 y 30 días del tratamiento así como al mes de haberlo finalizado se indican en tabla 11. La concentración de folato sérico en hombres alcanzó el máximo en el último día del tratamiento (día 30) y en mujeres se produjo antes, en el décimo día de tratamiento (Tabla 11).

Días de intervención	Total			Hombres			Mujeres		
	Media (nmol/L)	DE (nmol/L)	n	Media (nmol/L)	DE (nmol/L)	n	Media (nmol/L)	DE (nmol/L)	n
0	19,39	9,23	34	17,50	7,41	22	21,00	10,40	26
2	40,34	18,31	47	34,09	19,04	21	45,38	16,36	26
5	72,00	30,29	39	58,33	21,58	18	83,71	32,17	21
10	83,98	38,35	44	69,87	33,03	20	95,74	39,13	24
30	86,61	20,83	45	83,64	27,53	19	88,79	14,37	26
60	19,56	4,98	38	17,70	3,69	18	21,23	5,46	20

Tabla 11: Concentraciones de Folato sérico en el grupo de estudio y por sexos

4.2.2. Estadística inferencial de folato sérico

A partir del día 2 de tratamiento calculamos la variación en porcentaje del ascenso de folato sérico respecto al día 0. A excepción de 4 sujetos que en el día 2 no presentaron un incremento de folato sérico, todos los individuos mostraron un incremento porcentual del mismo respecto del nivel basal desde el segundo día hasta finalizar el tratamiento. En día 60, el 37.5% (n=18) de la población mostró un descenso de los niveles de folato sérico respecto al inicio de la intervención, el resto mantuvo niveles superiores al basal (Figura 15).

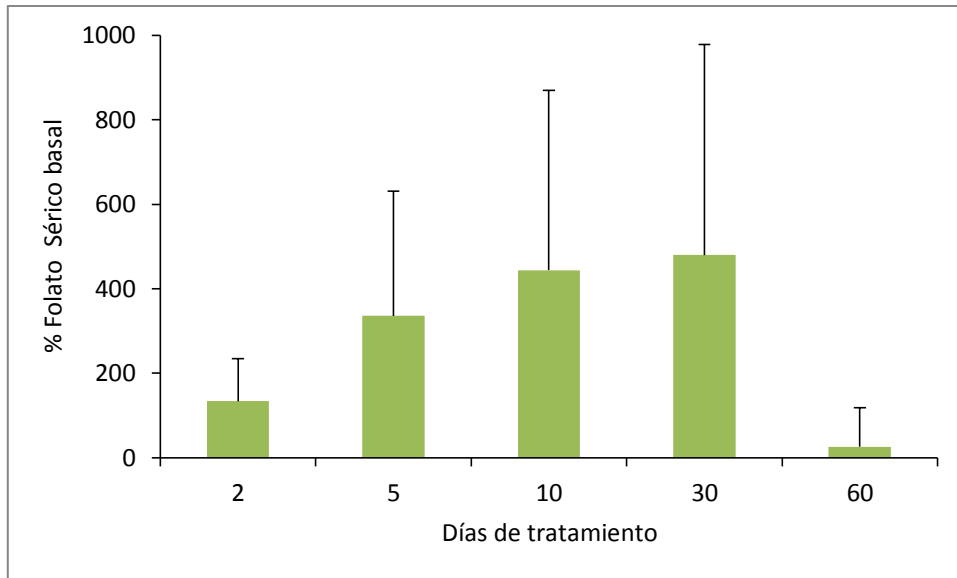


Figura 15. Variación porcentual de folato sérico respecto del nivel basal en la población total

La comparación entre sexos del porcentaje de aumento de folato sérico respecto del nivel basal no mostró diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tratamiento ni al mes de finalizarlo (Tabla 12)

Días de intervención	Hombres (Media ± DE%)	Mujeres (Media ± DE%)	Diferencia	IC 95%	t	p
2	109,53±88,22	153,71±108,12	-44,19	-209,70 - 298,10	0,45	> 0,05
5	286,20±167,78	379,09±370,66	-92,89	-185,10 - 370,80	0,87	> 0,05
10	363,48±262,59	510,79±520,98	-147,30	-114,70 - 409,30	1,46	> 0,05
30	450,59±307,85	501,00±607,64	-50,40	-210,80 - 311,60	0,50	> 0,05
60	23,96±76,44	28,06±107,00	-4,10	-277,00 - 285,20	0,04	> 0,05

Tabla 12. Comparación por día de tratamiento entre hombres y mujeres del % del Folato sérico respecto del nivel basal.

En el día 10 las mujeres alcanzaron el máximo de incremento porcentual de folato sérico respecto del basal llegando a un dintel máximo que se mantiene hasta el día 30, sin embargo en los hombres el folato sérico sigue aumentando hasta el último día de tratamiento (Figura 16)

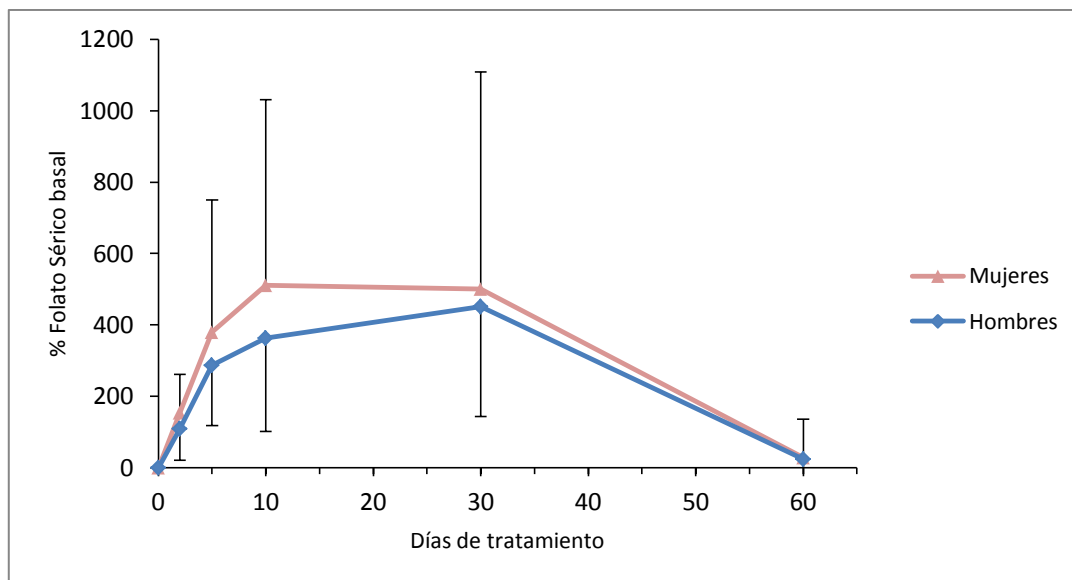


Figura 16: Representación gráfica de la evolución media del porcentaje de folato sérico respecto del nivel basal en hombres y en mujeres

4.3. HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA

4.3.1. Estadística descriptiva de niveles de homocisteína plasmática

Los niveles de Hcy cuantificados en nuestro grupo de estudio en el momento basal, a los 2, 5, 10 y 30 días del tratamiento así como al mes de haberlo iniciado se representan en la tabla 13

Días de intervención	Total			Hombres			Mujeres		
	Media (μmol/L)	DE (μmol/L)	n	Media (μmol/L)	DE (μmol/L)	n	Media (μmol/L)	DE (μmol/L)	n
0	10,33	3,06	48	11,33	2,87	22	9,48	3,01	26
2	7,46	2,15	48	8,69	2,16	22	6,42	1,53	26
5	6,75	1,47	44	7,68	1,29	21	5,90	1,06	23
10	5,91	1,18	45	6,58	1,12	21	5,33	0,90	24
30	5,43	1,19	45	6,20	1,08	19	4,86	0,93	26
60	7,11	1,90	38	8,30	1,51	18	6,04	1,56	20

Tabla 13. Concentraciones de Hcy en el grupo de estudio y por sexos

4.3.2. Estadística inferencial de Hcy plasmática

A partir del día 2 de tratamiento calculamos la variación en porcentaje de descenso de Hcy plasmática respecto al día 0. Todos los individuos mostraron concentraciones de Hcy inferiores desde el segundo día de tratamiento en adelante y al mes de haber finalizado, sólo un individuo mostró una concentración Hcy plasmática superior a la basal (Figura 17)

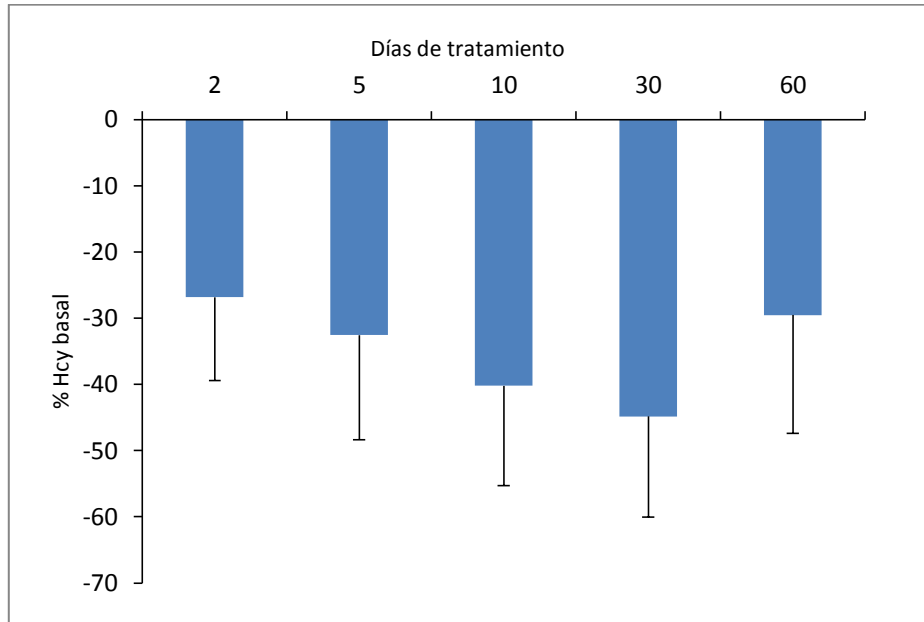


Figura 17. Variación porcentual de Hcy respecto del nivel basal en la población total

El descenso de Hcy plasmática en porcentaje no presentó diferencias estadísticamente significativas entre géneros como se muestra en la tabla 14.

Días de intervención	Hombres (Media ± DE%)	Mujeres (Media ± DE%)	Diferencia	IC 95%	t	p
2	-22,88±10,46	-30,21±13,37	7,33	-18,81 - 4,15	1,66	> 0,05
5	-30,64±14,54	-34,33±17,02	3,69	-15,65 - 8,27	0,80	> 0,05
10	-39,44±16,27	-40,88±14,22	1,44	-13,28 - 10,40	0,32	> 0,05
30	-43,97±15,44	-45,51±15,34	1,54	-13,50 - 10,42	0,33	> 0,05
60	-25,54±17,89	-33,11±17,61	7,57	-20,44 - 5,31	1,53	> 0,05

Tabla 14. Comparación por día de tratamiento entre hombres y mujeres del % de Hcy plasmática respecto del nivel basal.

4.4. VITAMINA B₁₂ SÉRICA

4.4.1. Estadística descriptiva de niveles de vitamina B₁₂ sérica

Los niveles de vitamina B₁₂ cuantificados en nuestro grupo de estudio en el momento basal, a los 2, 5, 10 y 30 días del tratamiento así como al mes de haberlo iniciado se representan en la tabla 15

Días de intervención	Total			Hombres			Mujeres		
	Media (pmol/L)	DE (pmol/L)	n	Media (pmol/L)	DE (pmol/L)	n	Media (pmol/L)	DE (pmol/L)	n
0	364,74	164,24	48	322,67	105,29	22	400,33	196,27	26
2	323,89	180,90	45	327,75	239,51	19	321,07	127,55	26
5	327,93	105,05	29	354,60	147,80	8	320,97	94,00	23
10	305,05	121,03	42	255,02	82,43	18	342,57	132,89	24
30	295,16	142,54	45	257,05	133,10	19	323,02	145,24	26
60	308,07	108,55	38	273,50	84,80	18	339,19	119,83	20

Tabla 15: Concentraciones de vitamina B₁₂ en el grupo de estudio y por sexos

Los niveles de vitamina B₁₂ no presentaron cambios significativos en nuestra intervención entre los diferentes días por lo que no evaluamos la evolución en porcentaje respecto del nivel basal.

4.5. EVOLUCIÓN DE LOS DATOS BIOQUÍMICOS EN AMBOS SEXOS

En la figura 18 se muestra cómo evolucionaron las magnitudes bioquímicas en la población diferenciada por sexos

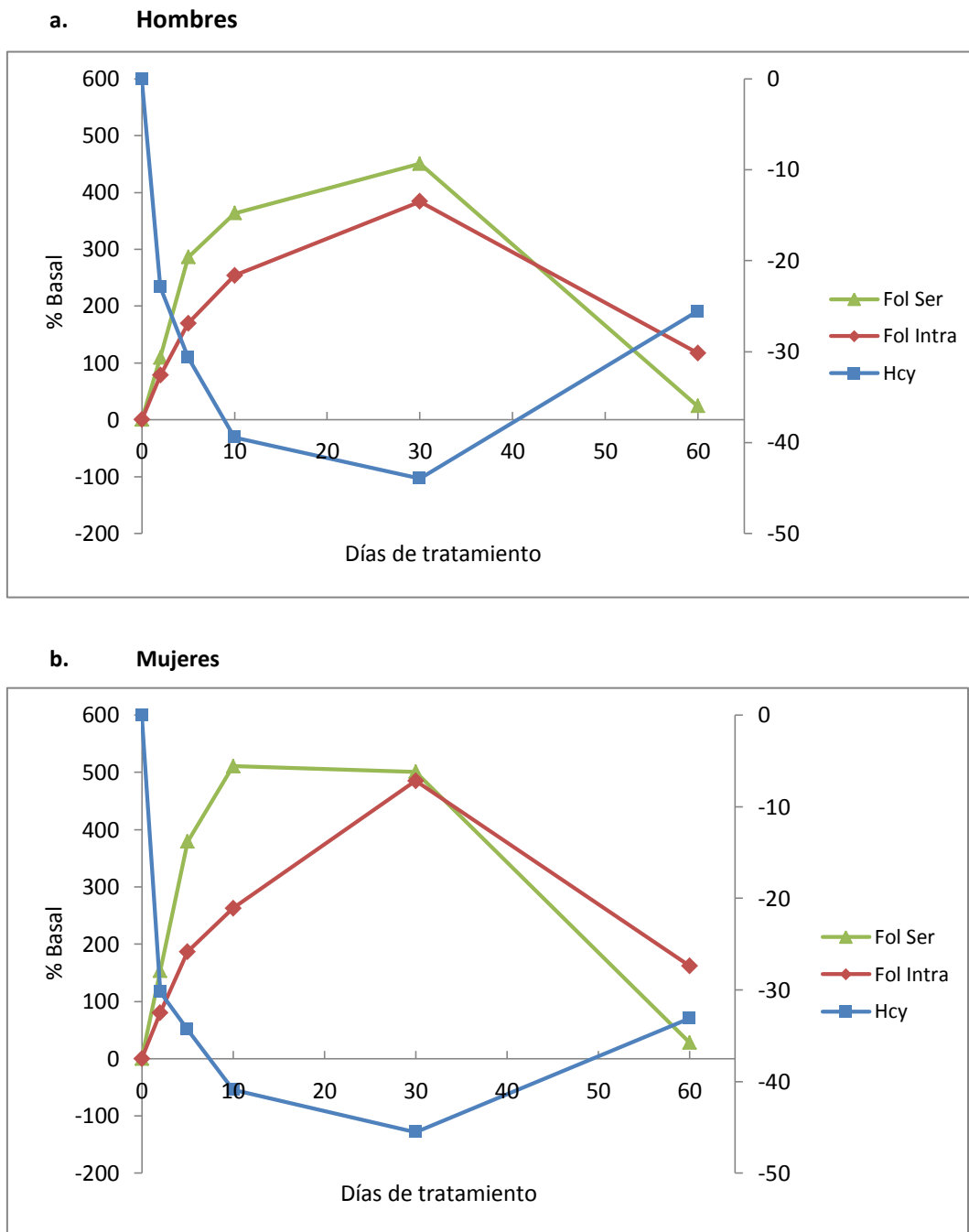


Figura 18. Representación gráfica de la variación porcentual respecto del nivel basal (%Basal) de las 3 magnitudes bioquímicas durante el tratamiento (30 días) y al mes de haberlo finalizado (día 60) en el grupo de hombres (a.) y mujeres (b.)

4.5.1. Correlación de los niveles de Hcy y folatos

A continuación representamos en las figuras 19 y 20 el ajuste de regresión de Hcy y folatos sérico e intraeritrocitario en la población dividida por sexos. La ecuación de regresión que mejor se ajusta a nuestros datos es la potencial ($y=a \cdot b^x$). La mayor contribución al descenso de Hcy fue la llevada a cabo por el folato intraeritrocitario

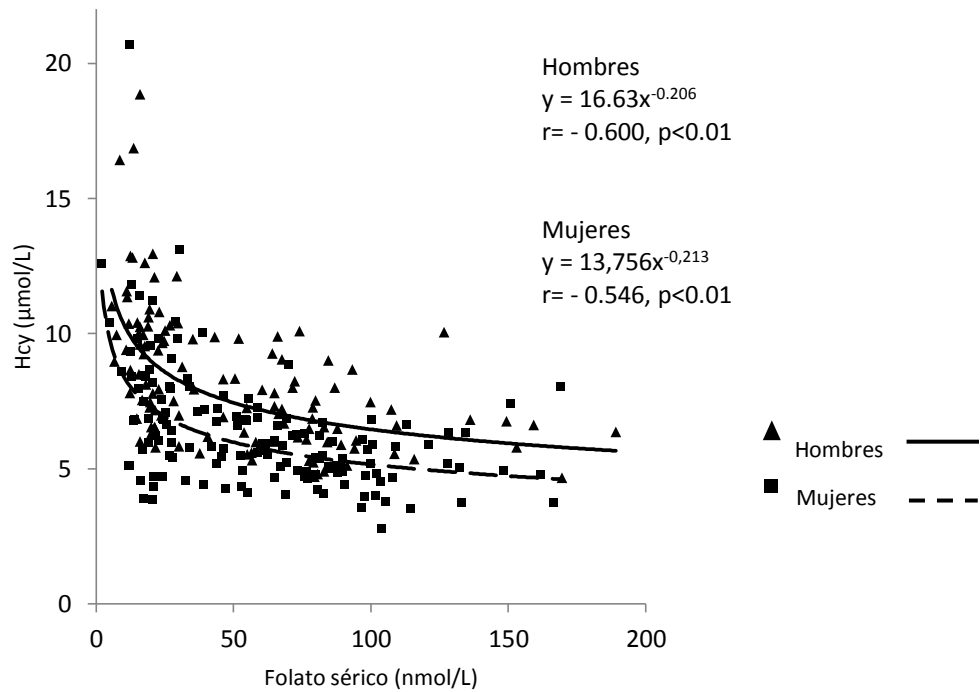


Figura 19. Concentración de Hcy frente a folato sérico, curva y de regresión, coeficiente de correlación y valor de p

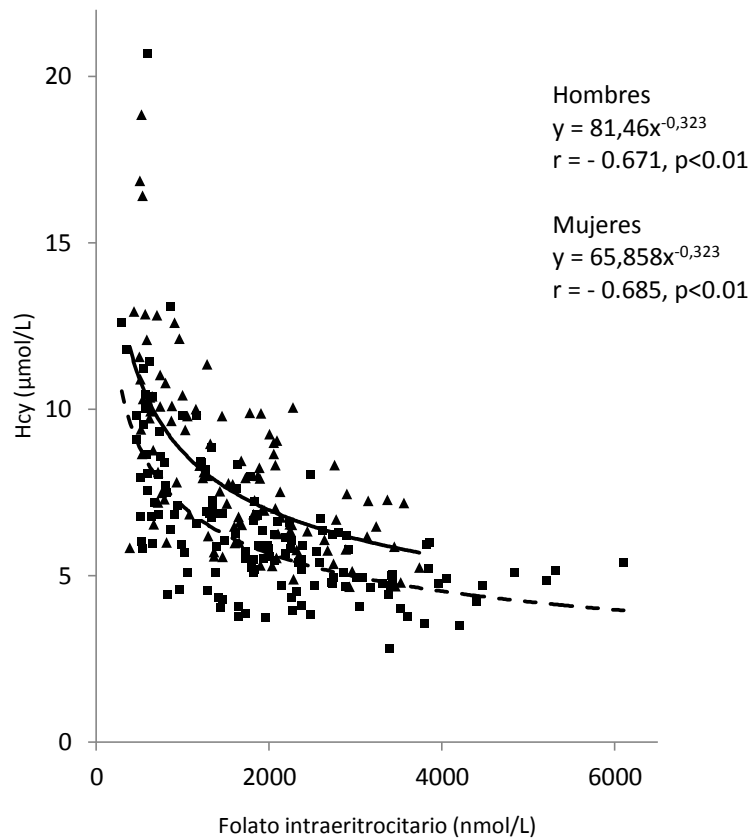


Figura 20. Concentración de Hcy frente a folato sérico, curva de regresión, coeficiente de correlación y valor de p

4.5.2. Ratios Folatos/Hcy

Los resultados obtenidos establecieron diferencias significativas en la evolución de la concentración de folatos y Hcy en los distintos compartimentos fisiológicos. Entre sexos no hubo diferencias significativas en cuanto a la razón de folatos entre compartimentos (Tabla 16).

Folato intraeritrocitario/sérico
(nmol/nmol)

Día de tratamiento	Hombres			Mujeres			Dif.	t	p
	Media	DE	n	Media	DE	n			
0	44,20	25,46	22	42,16	27,81	26	-2,04	0,32	> 0,05
2	42,44	29,03	21	28,98	14,17	26	-13,46	2,10	> 0,05
5	35,24	22,65	18	26,19	9,80	21	-9,05	1,29	> 0,05
10	37,63	20,19	18	29,08	12,99	21	-8,55	1,22	> 0,05
30	38,35	15,82	18	43,26	11,38	26	4,91	0,73	> 0,05
60	85,03	51,69	9	84,79	19,81	20	-0,24	0,03	> 0,05

Tabla 16: Ratios Folato intraeritrocitario/sérico en ambos sexos

La ratio de folatos tanto sérico como intraeritrocitario y Hcy presentó una evolución fuertemente significativa entre géneros a partir del día 5 hasta el día 30 (Tablas 17 y 18)

Folato intraeritrocitario/Hcy
(nmol/μmol)

Día de tratamiento	Hombres			Mujeres			Dif.	t	p
	Media	DE	n	Media	DE	n			
0	60,47	22,50	22	81,03	39,47	26	20,56	0,56	> 0,05
2	139,81	77,53	22	203,37	102,26	26	63,56	1,75	> 0,05
5	223,11	61,42	21	349,45	131,18	23	126,3	3,32	<0,01
10	335,17	88,94	19	494,56	142,40	21	159,4	3,99	<0,001
30	497,59	146,86	18	808,88	244,51	26	311,3	8,06	<0,001
60	212,39	90,90	8	323,42	153,65	20	111	2,11	> 0,05

Tabla 17: Ratios Folato intraeritrocitario/Hcy en ambos sexos

Folato sérico/Hcy (nmol/ μ mol)									
Día de tratamiento	Hombres			Mujeres			Dif.	t	p
	Media	DE	n	Media	DE	n			
0	1,66	0,85	22	2,46	1,46	26	-0,81	0,57	> 0,05
2	4,26	2,58	21	7,61	3,53	26	-3,36	2,34	> 0,05
5	7,74	3,04	18	14,65	7,00	21	-6,91	4,40	<0,001
10	11,04	5,76	20	18,55	8,83	24	-7,50	5,07	<0,001
30	14,22	6,54	19	19,30	6,53	26	-5,08	3,45	<0,01
60	2,23	0,73	18	3,69	1,16	20	-1,46	0,92	> 0,05

Tabla 18. Ratios Folato sérico/Hcy en ambos sexos

4.6. ANÁLISIS POBLACIONAL DE LOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS

En la tabla 19 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas de todos los polimorfismos estudiados en nuestra población. Todos los polimorfismos se hallaron en equilibrio de Hardy-Weinberg excepto el TYMS rs34489327.

Nombre del gen	Referencia	Alelo		Genotipo			Población						Modelo
		A1	A2	G1	G2	G3	G1	G2	G3	A1	A2	HW	
SHMT1	rs1979276	A	G	A/A	A/G	G/G	1(0,02)	8(0,18)	36(0,80)	10(0,11)	80(0,89)	0,43	Dominante
	rs1979277	A	G	A/A	A/G	G/G	2(0,05)	19(0,43)	23(0,52)	23(0,26)	65(0,74)	0,70	Dominante
	rs643333	A	C	A/A	A/C	C/C	1(0,02)	15(0,33)	30(0,65)	17(0,18)	75(0,829)	1,00	Dominante
	rs638416	C	G	C/C	C/G	G/G	11(0,24)	18(0,39)	17(0,37)	40(0,43)	52(0,57)	0,23	Recesivo
	rs3783	C	G	C/C	C/G	G/G	1(0,02)	20(0,44)	24(0,53)	22(0,24)	68(0,76)	0,25	Dominante
TYMS	rs2853542	C	G	C/C	C/G	G/G	30(0,65)	16(0,35)	0(0)	76(0,83)	16(0,17)	0,32	-
	rs34489327	D	I	DD	DI	II	1(0,02)	26(0,6)	16(0,37)	28(0,33)	58(0,67)	0,02*	-
	rs34743033	2R	3R	2R2R	2R3R	3R3R	10(0,24)	17(0,41)	14(0,34)	37(0,45)	45(0,55)	0,35	Recesivo
TCN2	rs9606756	A	G	A/A	A/G	G/G	33(0,77)	9(0,21)	1(0,02)	75(0,87)	11(0,13)	0,52	Dominante
	rs1801198	C	G	C/C	C/G	G/G	12(0,26)	25(0,54)	9(0,2)	49(0,53)	43(0,47)	0,77	Recesivo
MTHFR	rs1801131	A	C	A/A	A/C	C/C	27(0,61)	17(0,39)	0(0)	71(0,81)	17(0,19)	0,32	-
	rs1801133	C	T	C/C	C/T	T/T	15(0,32)	22(0,47)	10(0,21)	52(0,55)	42(0,45)	0,77	Dominante
CBS	rs5742905	C	T	C/C	C/T	T/T	2(0,05)	11(0,26)	29(0,69)	15(0,18)	69(0,82)	0,59	Dominante
	cbs844ins68	S	L	SS	SL	LL	28(0,78)	8(0,22)	0(0)	64(0,89)	8(0,11)	1,00	-
ABC1	rs1045642	C	T	C/C	C/T	T/T	13(0,2)	24(0,52)	9(0,20)	50(0,54)	42(0,46)	1,00	Dominante
ATIC	rs2372536	C	G	C/C	C/G	G/G	20(0,53)	11(0,29)	7(0,18)	51(0,67)	25(0,33)	0,06	Dominante
BHMT	rs3733890	A	G	A/A	A/G	G/G	15(0,33)	21(0,46)	10(0,22)	51(0,55)	41(0,45)	0,76	Dominante
DHFR	DHFR19del	+	-	++	+-	--	17(0,41)	20(0,49)	4(0,10)	54(0,66)	28(0,349)	0,74	Dominante
MTHFD1	rs2236225	C	T	C/C	C/T	T/T	9(0,22)	18(0,44)	14(0,34)	36(0,44)	46(0,56)	0,53	Recesivo
MTR	rs1805087	A	G	A/A	A/G	G/G	30(0,67)	14(0,31)	1(0,02)	74(0,82)	16(0,18)	1,00	Dominante
MTRR	rs1801394	A	G	A/A	A/G	G/G	10(0,24)	21(0,51)	10(0,24)	41(0,50)	41(0,50)	1,00	Recesivo
RFC1	rs1051266	A	G	A/A	A/G	G/G	13(0,28)	25(0,54)	8(0,17)	51(0,55)	41(0,45)	0,57	Dominante
ESR1	rs9340799	A	G	A/A	A/G	G/G	18(0,41)	22(0,5)	4(0,09)	58(0,64)	30(0,36)	0,74	Recesivo
	rs2234693	C	T	C/C	C/T	T/T	8(0,17)	24(0,54)	12(0,18)	48(0,55)	40(0,45)	0,76	Recesivo

Tabla 19: Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos estudiados en nuestra población. Se representa número de sujetos y entre paréntesis la frecuencia.

Abreviaturas: A1: alelo 1, A2: alelo2, G1: genotipo 1, G2: genotipo2, G3: genotipo 3, HW: p equilibrio de Hardy Weinberg

4.7. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS SEGÚN EL GENOTIPO

A continuación se muestra el análisis estadístico de la variación porcentual respecto del nivel basal de los parámetros bioquímicos en función de los genotipos de aquellos polimorfismos estudiados que mostraron significación estadística en alguno de los parámetros bioquímicos en los diferentes días del tratamiento.

4.7.1. ATIC rs2372536 (c.347C>G)

En el día 30 de tratamiento los individuos GG mostraron un incremento significativamente mayor de folato intraeritrocitario respecto del nivel basal (Tabla 20). Aunque este aumento se observó también en los folatos séricos, éste no fue significativo. En el resto de parámetros no obtuvimos diferencias significativas entre los genotipos. Tampoco hubo diferencias para este genotipo al distribuir a la población por sexos.

a.Total		CC-CG			GG					
	Día de tratamiento	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	70,56	67,16	30	105,55	63,27	7	-34,99	0,75	> 0,05
	5	157,25	71,45	29	238,15	33,89	5	-80,9	1,49	> 0,05
	10	234,92	72,07	27	341,39	171,57	4	-106,5	1,78	> 0,05
	30	408,06	163,33	28	586,62	302,83	6	-178,6	3,55	<0,01*
	60	151,74	75,91	19	207,9	148,27	3	-56,16	0,81	> 0,05
sFol	2	137,39	98,72	30	181,6	113,31	6	-44,21	0,27	> 0,05
	5	380,52	358,94	24	256,64	153,71	5	123,9	0,69	> 0,05
	10	485,25	487,55	28	472,36	369,74	6	12,88	0,08	> 0,05
	30	437,47	260,72	29	794,01	1230,94	6	-356,5	2,18	> 0,05
	60	20,1	60,45	24	108,33	223,29	4	-88,23	0,45	> 0,05
Hcy	2	-28,65	10,96	30	-23,07	12,85	7	5,58	0,86	> 0,05
	5	-34,71	16,35	29	-28,93	18,96	5	5,78	0,77	> 0,05
	10	-40,79	15,02	29	-41,4	15,34	6	-0,6	0,09	> 0,05
	30	-43,26	16,11	29	-48,81	16,63	6	-5,55	0,8	> 0,05
	60	-31,25	17,28	24	-27,65	22,68	4	3,6	0,43	> 0,05

Tabla 20 (continúa en la siguiente página)

b. Hombres

	CC-CG				GG					
	Día de tratamiento	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	70,28	64,95	14	92,62	94,83	2	-22,34	0,32	> 0,05
	5	140,1	44,93	14	224,72	44,14	2	-84,62	1,23	> 0,05
	10	218,18	63,32	12	417,08	0	1	-198,9	2,1	> 0,05
	30	347,43	159,19	12	446,41	0	1	-98,98	1,04	> 0,05
	60	122,38	72,3	6						
sFol	2	113,37	92,88	14	69,06	0	1	44,31	0,2	> 0,05
	5	268,85	183,7	11	289,6	262,97	2	-20,75	0,13	> 0,05
	10	425,26	293	12	290,7	268,57	2	134,6	0,83	> 0,05
	30	446,19	292,02	13	171,54	0	1	274,7	1,25	> 0,05
	60	31,56	71,66	11	-45,89	0	1	77,45	0,35	> 0,05
Hcy	2	-23,31	8,56	14	-21,54	4,15	2	1,78	0,15	> 0,05
	5	-34,3	14,39	14	-14,29	13,36	2	20,02	1,74	> 0,05
	10	-40,41	16,82	13	-39,98	2,66	2	0,43	0,04	> 0,05
	30	-41,43	17,49	13	-53,83	0	1	-12,4	0,79	> 0,05
	60	-26,43	19	11	-7,59	0	1	18,84	1,19	> 0,05

c. Mujeres

	CC-CG				GG					
	Día de tratamiento	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	70,82	71,16	16	110,73	60,33	5	-39,91	0,63	> 0,05
	5	173,26	88,13	15	247,1	31,96	3	-73,84	0,95	> 0,05
	10	248,33	77,86	15	316,15	200,83	3	-67,83	0,87	> 0,05
	30	453,53	155,84	16	614,66	329,75	5	-161,1	2,55	> 0,05
	60	165,29	76,4	13	207,9	148,27	3	-42,61	0,54	> 0,05
sFol	2	158,4	101,76	16	204,11	110,67	5	-45,7	0,2	> 0,05
	5	475	444,65	13	234,67	104,25	3	240,3	0,84	> 0,05
	10	530,24	599,9	16	563,2	413,28	4	-32,96	0,13	> 0,05
	30	430,39	241,97	16	918,5	1333,33	5	-488,1	2,14	> 0,05
	60	10,4	50,02	13	159,74	242,76	3	-149,3	0,52	> 0,05
Hcy	2	-33,33	10,9	16	-23,69	15,55	5	9,64	1,21	> 0,05
	5	-35,08	18,5	15	-38,69	16,5	3	-3,61	0,37	> 0,05
	10	-41,1	13,94	16	-42,1	19,7	4	-1,01	0,12	> 0,05
	30	-44,75	15,31	16	-47,81	18,39	5	-3,06	0,38	> 0,05
	60	-35,33	15,24	13	-34,33	22,44	3	1	0,1	> 0,05

Tabla 20. Comparación de los parámetros bioquímicos en función del polimorfismo ATIC rs2372536, 347C>G en el grupo total (a.) en hombres (b.) y mujeres (c.). Abreviaturas: iFol, folato intraeritrocitario; sFol, folato sérico; Hcy: Homocisteína

4.7.2. BMHT rs3733890 (c.716G>A)

En el grupo no se observó diferente comportamiento de los parámetros bioquímicos según el genotipo de este polimorfismo de la BMHT. Sin embargo, cuando dividimos la población estudiada por sexo, en los hombres AA la Hcy plasmática fue significativamente menor en el día 5 que en los AG-GG. En el grupo de mujeres ni folato sérico e intraeritrocitario ni Hcy mostraron un comportamiento diferente en los genotipos de la BHMT estudiados (Tabla 21).

a.Total										
AA					AG-GG					
	Día de tratamiento	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	96,59	57,96	15	73,41	68,41	30	-23,18	0,64	> 0,05
	5	167,91	53,04	14	183,29	84,37	28	15,38	0,41	> 0,05
	10	237,39	108,96	12	264,13	100,1	25	26,74	0,67	> 0,05
	30	500,45	237,59	15	419,65	156,35	26	-80,8	2,18	> 0,05
	60	171,07	105,95	8	143,75	77,93	18	-27,32	0,56	> 0,05
sFol	2	157,15	85,96	14	125,36	107,88	30	-31,79	0,29	> 0,05
	5	223,56	122,12	11	379,22	342,63	26	155,7	1,28	> 0,05
	10	398,79	303,36	14	477,04	493,46	27	78,25	0,7	> 0,05
	30	567,97	786,23	15	407,31	244,35	27	-160,7	1,48	> 0,05
	60	48,27	125,99	13	8,91	60,29	22	-39,36	0,33	> 0,05
Hcy	2	-27,49	9,99	15	-27,18	13,54	30	0,32	0,06	> 0,05
	5	-37,89	15,72	14	-30,44	15,97	28	7,44	1,46	> 0,05
	10	-44,81	14,05	14	-37,88	16,03	28	6,93	1,36	> 0,05
	30	-47,65	13,4	15	-43,27	16,98	27	4,38	0,87	> 0,05
	60	-32,49	14,29	13	-29,44	20,51	22	3,06	0,56	> 0,05

Tabla 21. (continúa en la siguiente página)

b. Hombres

	Día de tratamiento	AA			AG-GG			Diferencia	t	p
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n			
iFol	2	92,65	70,02	8	76,33	63	12	-16,31	0,35	> 0,05
	5	155,29	42,64	8	182,19	88,56	12	26,91	0,57	> 0,05
	10	218,45	83,41	7	285,02	115,35	10	66,57	1,31	> 0,05
	30	425,85	148,22	8	355,29	182,39	8	-70,56	1,37	> 0,05
	60	162,86	56,2	2	109,54	69,2	5	-53,32	0,62	> 0,05
sFol	2	126,96	71,73	7	95,03	93,57	12	-31,93	0,35	> 0,05
	5	204,73	102,96	5	300,55	177,15	12	95,82	0,94	> 0,05
	10	408,85	258,77	8	349,54	275,25	10	-59,31	0,65	> 0,05
	30	436,34	270,85	8	382,76	276,25	9	-53,58	0,57	> 0,05
	60	22,38	61,15	7	13,86	69,18	9	-8,52	0,09	> 0,05
Hcy	2	-27,08	11,32	10	-24,34	11,35	12	2,74	0,43	> 0,05
	5	-41,63	11,63	10	-24,62	13,41	12	17	2,69	< 0,05*
	10	-46,79	13,25	9	-34,55	18,14	11	12,24	1,84	> 0,05
	30	-51,13	11,01	10	-37,71	17,83	9	13,41	1,98	> 0,05
	60	-31,19	13,28	9	-24,41	23,3	9	6,78	0,97	> 0,05

c. Mujeres

	Día de tratamiento	AA			AG-GG			Diferencia	t	p
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n			
iFol	2	101,09	45,53	7	71,46	73,53	18	-29,64	0,56	> 0,05
	5	184,74	64,61	6	184,11	84,03	16	-0,63	0,01	> 0,05
	10	263,91	143,89	5	250,19	90,02	15	-13,71	0,22	> 0,05
	30	585,71	300,3	7	448,26	139,41	18	-137,5	2,58	> 0,05
	60	173,81	122,67	6	156,91	79,57	13	-16,9	0,29	> 0,05
sFol	2	187,34	93,46	7	145,59	114,48	18	-41,76	0,22	> 0,05
	5	239,25	143,87	6	446,65	434,27	14	207,4	1,01	> 0,05
	10	385,36	380,97	6	552,04	580,47	17	166,7	0,84	> 0,05
	30	718,4	1143,4	7	419,59	234,36	18	-298,8	1,6	> 0,05
	60	78,47	177,71	6	5,48	56,02	13	-72,99	0,35	> 0,05
Hcy	2	-28,32	7,72	5	-29,07	14,83	18	-0,74	0,09	> 0,05
	5	-28,53	22,38	4	-34,81	16,73	16	-6,28	0,69	> 0,05
	10	-41,26	16,29	5	-40,04	14,67	17	1,23	0,15	> 0,05
	30	-40,68	16,27	5	-46,04	16,33	18	-5,36	0,66	> 0,05
	60	-35,43	18,16	4	-32,91	18,49	13	2,51	0,27	> 0,05

Tabla 21. Comparación de los parámetros bioquímicos en función del polimorfismo **BMHT rs3733890, 716G>A** en el grupo total (a.) en hombres (b.) y mujeres (c.). Abreviaturas: *iFol*, folato intraeritrocitario; *sFol*, folato sérico; *Hcy*: Homocisteína, * $p < 0.05$

4.7.3. ESR1

En nuestro estudio hayamos un desequilibrio de ligamiento casi completo entre los polimorfismos rs9340799 y rs2234693 del gen ESR1, como ya ha sido descrito previamente por múltiples autores (Sundermann et al., 2010) (Fox et al., 2005)(Bos et al., 2008). La frecuencia haplotípica que observamos se asemeja a la publicada en otras poblaciones, representado en la tabla 22.

rs9340799	rs2234693	Grupo (n=44)	Hombres (n=20)	Mujeres (n=24)
A	T	0,55	0,60	0,50
G	C	0,34	0,33	0,35
A	C	0,11	0,08	0,15
G	T	0	0	0

Tabla 22. Frecuencia de haplotipos en la población de estudio

El análisis del desequilibrio de ligamiento en nuestra población mostró un desequilibrio casi completo: $D'=0.9997$, $p<0.001$.

4.7.3.1. ESR1 rs2234693 (Pvull, c.453-397 T>C)

No se observaron diferencias significativas en el folato intraeritrocitario y Hcy plasmática al comparar los sujetos CC (genotipo homocigoto mutado) en los diferentes días de tratamiento. En cambio, el folato sérico el día 30 en los individuos CC presentó un incremento porcentual significativamente mayor respecto del nivel basal respecto de los CT-TT (Tabla 23).

Al dividir la población por sexos, en los hombres no se observaron diferencias entre los genotipos en los 3 parámetros bioquímicos estudiados durante todo el tratamiento y al mes de finalizarlo. Sin embargo en las mujeres, el genotipo CC es el que muestra un incremento porcentual significativamente mayor respecto del nivel basal tanto en folato intraeritrocitario como en el sérico el día 30 como se muestra en la tabla 23.

a.Total

	CC				CT-TT					
	Día de tratamiento	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	138,24	38,79	8	68,08	63,19	37	70,16	1,57	> 0,05
	5	200,91	62,9	5	175,59	77,81	36	25,32	0,46	> 0,05
	10	261,95	56,92	6	253,27	109,81	31	8,68	0,17	> 0,05
	30	513,78	301,67	7	436,59	163,07	34	77,2	1,62	> 0,05
	60	163,42	130,76	6	142,44	74,07	20	-0,98	0,39	> 0,05
sFol	2	119,76	125,63	8	134,57	98,44	36	-14,81	0,11	> 0,05
	5	209,25	93,75	5	354,97	323,54	31	-145,7	0,9	> 0,05
	10	337,37	370,22	7	460,35	449,25	35	-123	0,89	> 0,05
	30	773,65	1126,02	7	408,54	243,81	35	-365,1	2,63	< 0,05*
	60	44,49	162,57	8	15,59	60,18	27	-28,89	0,21	> 0,05
Hcy	2	-29,14	12,47	8	-27,46	12,06	37	1,68	0,28	> 0,05
	5	-34,52	20,44	5	-33,16	15,74	36	1,36	0,18	> 0,05
	10	-37,42	24,52	7	-41,15	13,25	35	-3,73	0,58	> 0,05
	30	-50,32	19,86	7	-44,14	14,8	35	6,19	0,96	> 0,05
	60	-31,88	22,89	8	-29,28	16,93	27	2,61	0,42	> 0,05

b. Hombres

	CC				CT-TT					
	Día de tratamiento	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	120,53	29,89	5	68,55	67,69	15	51,98	0,95	> 0,05
	5	196,11	71,56	4	165,81	77,46	15	30,3	0,51	> 0,05
	10	241,94	32,37	5	261,74	126,38	12	-19,8	0,35	> 0,05
	30	367,92	205,57	4	400,02	157,82	12	-32,09	0,53	> 0,05
	60	81,39	51,18	3	125,63	70,67	4	-44,24	0,55	> 0,05
sFol	2	55,41	51,81	5	113,82	90,48	14	-58,41	0,59	> 0,05
	5	191,85	98,49	4	299,53	179,93	12	-107,7	0,98	> 0,05
	10	204,89	137,62	5	410,9	285,61	14	-206	2,08	> 0,05
	30	368,46	219,2	4	435,33	281,4	13	-66,87	0,61	> 0,05
	60	-12,08	34,59	5	26,85	74,32	11	-38,93	0,38	> 0,05
Hcy	2	-24,43	12,68	5	-24,79	8,02	15	0,37	0,05	> 0,05
	5	-30,85	21,62	4	-31,7	13,64	15	0,85	0,1	> 0,05
	10	-32,84	27,84	5	-42,75	10,88	14	9,91	1,24	> 0,05
	30	-43,99	25,69	4	-44,84	13,44	13	0,85	0,1	> 0,05
	60	-25,42	25,29	5	-24,55	15,3	11	-0,86	0,1	> 0,05

Tabla 23. (continúa en la siguiente página)

c. Mujeres

	CC				CT-TT					
	Día de tratamiento	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	167,75	37,25	3	67,76	61,56	22	100	1,42	> 0,05
	5	220,11	84,3	2	182,58	79,2	21	-37,53	0,32	> 0,05
	10	361,98	108,12	2	247,92	101,28	19	-114,1	0,97	> 0,05
	30	708,26	332,17	3	456,53	166,01	22	-251,7	3,58	<0,01*
	60	245,45	141,21	3	146,64	76,52	16	-98,81	1,37	> 0,05
sFol	2	227,01	149,22	3	147,77	103,02	22	-79,24	0,32	> 0,05
	5	278,86	263	2	389,99	389,02	19	111,1	0,27	> 0,05
	10	668,57	662,91	2	493,32	535,93	21	-175,3	0,59	> 0,05
	30	1313,9	1722,08	3	392,71	224,25	22	-921,2	3,74	<0,01*
	60	138,77	262,25	3	7,86	49,39	16	-130,9	0,52	> 0,05
Hcy	2	-36,98	8,68	3	-29,28	14,07	22	7,71	0,8	> 0,05
	5	-49,19	0	1	-34,2	17,33	21	14,99	0,94	> 0,05
	10	-48,87	11,89	2	-40,08	14,77	21	8,79	0,76	> 0,05
	30	-58,77	2,38	3	-43,72	15,85	22	15,04	1,57	> 0,05
	60	-42,66	16,6	3	-32,52	17,69	16	10,13	1,03	> 0,05

Tabla 23. Comparación de los parámetros bioquímicos en función del polimorfismo **ESR1 rs2234693**, PvuII, T>C en el grupo total (a.) en hombres (b.) y mujeres (c.). Abreviaturas: *iFol*, folato intraeritrocitario; *sFol*, folato sérico; *Hcy*: Homocisteína, * $p < 0.05$

4.7.3.2. ESR1 rs9340799 (XbaI, c.453-351 A>G)

No se observan diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados al comparar los sujetos AA con los que muestran uno o dos alelos variantes (AG-GG) en los diferentes días de tratamiento. Tampoco existe diferencia en este SNP cuando dividimos la población por género (Tabla 24).

a.Total

	Día de tratamiento	AA			AG-GG			Diferencia	t	p
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n			
iFol	2	47,06	59,62	18	102,88	59,67	27	-55,82	1,6	> 0,05
	5	147,45	57,34	18	203,11	80,72	23	-55,66	1,54	> 0,05
	10	238,17	62,62	12	262,6	117,32	25	-24,43	0,61	> 0,05
	30	432,79	153,68	16	460,63	213,73	25	-27,85	0,76	> 0,05
	60	147,48	86,58	9	147,18	90,76	17	0,3	0,01	> 0,05
sFol	2	145,94	107,6	17	123,02	100,07	27	22,93	0,22	> 0,05
	5	451,86	414,81	16	241,03	123,74	20	210,8	1,87	> 0,05
	10	553,8	606,16	16	369,73	277,53	26	184,1	1,72	> 0,05
	30	495,33	292,41	17	451,75	613,02	25	43,58	0,41	> 0,05
	60	34,43	74,36	13	14,97	101,15	22	19,47	0,17	> 0,05
Hcy	2	-29,69	12,95	18	-26,46	11,4	27	-3,23	0,68	> 0,05
	5	-32,75	16,51	18	-33,77	16,1	23	1,01	0,21	> 0,05
	10	-42,53	13,81	16	-39,29	16,36	26	-3,23	0,65	> 0,05
	30	-44,89	16,06	17	-45,36	15,69	25	0,47	0,1	> 0,05
	60	-28,95	20,79	13	-30,41	16,84	22	1,46	0,27	> 0,05

b. Hombres

	Día de tratamiento	AA			AG-GG			Diferencia	t	p
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n			
iFol	2	53,04	59,44	10	110,05	57,55	10	57,01	1,24	> 0,05
	5	135,86	49,92	10	212,55	80,6	9	76,7	1,63	> 0,05
	10	231,17	55,84	7	273,24	131,35	10	42,07	0,83	> 0,05
	30	373,32	142,24	8	410,67	191,48	8	37,35	0,73	> 0,05
	60	125,63	70,67	4	81,39	51,18	3	-44,24	0,56	> 0,05
sFol	2	105,23	96,32	9	92,34	77,97	10	-12,89	0,14	> 0,05
	5	284,15	202,59	8	261,07	136,57	8	-23,08	0,24	> 0,05
	10	370,82	330,64	9	343,96	214,63	10	-26,86	0,3	> 0,05
	30	486,69	327,68	9	344,1	152,57	8	-142,6	1,51	> 0,05
	60	40,85	84,01	8	-11,49	26,38	8	-52,33	0,54	> 0,05
Hcy	2	-26,35	8,78	10	-23,06	9,4	10	3,29	0,48	> 0,05
	5	-32,97	13,45	10	-29,91	17,09	9	3,06	0,43	> 0,05
	10	-44	11,41	9	-36,68	20,3	10	7,32	1,04	> 0,05
	30	-44,9	15,81	9	-44,35	17,52	8	0,56	0,07	> 0,05
	60	-22,41	16,58	8	-27,24	20,3	8	-4,83	0,63	> 0,05

Tabla 24. (continúa en la siguiente página)

c. Mujeres

	Día de tratamiento	AA			AG-GG			Diferencia	t	p
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n			
iFol	2	39,58	63,04	8	98,66	62,23	17	59,08	1,12	> 0,05
	5	161,95	65,94	8	197,05	83,24	14	35,1	0,64	> 0,05
	10	247,98	76,81	5	255,5	111,22	15	7,53	0,12	> 0,05
	30	492,26	149,31	8	484,15	225,04	17	-8,11	0,15	> 0,05
	60	164,95	101,91	5	161,28	92,32	14	-3,67	0,06	> 0,05
sFol	2	191,74	106,44	8	141,06	109,18	17	-50,68	0,29	> 0,05
	5	619,57	513,2	8	227,67	118,71	12	-391,9	2,09	> 0,05
	10	789,06	811,18	7	385,84	316,24	16	-403,2	2,17	> 0,05
	30	505,05	269,3	8	502,41	738,23	17	-2,64	0,02	> 0,05
	60	24,17	63,43	5	30,09	124,41	14	5,91	0,03	> 0,05
Hcy	2	-33,88	16,49	8	-28,47	12,25	17	5,41	0,79	> 0,05
	5	-32,49	20,71	8	-36,24	15,55	14	-3,76	0,53	> 0,05
	10	-40,64	17,21	7	-40,93	13,83	16	-0,29	0,04	> 0,05
	30	-44,88	17,44	8	-45,84	15,31	17	-0,96	0,14	> 0,05
	60	-39,43	24,35	5	-32,23	15,04	14	7,21	0,87	> 0,05

Tabla 24. Comparación de los parámetros bioquímicos en función del polimorfismo **ESR1 rs9340799, XbaI, A>G** en el grupo total (a.) en hombres (b.) y mujeres (c.). Abreviaturas: *iFol*, folato intraeritrocitario; *sFol*, folato sérico; *Hcy*: Homocisteína

4.7.3.3. Análisis de los haplotipos

En los sujetos que portan el alelo G apreciamos una tendencia los días 2, 5 Y 10 a introducir más folato dentro del hematíe ya que las variaciones porcentuales del folato intraeritrocitario fueron superiores respecto a los que son AA y el incremento sérico fue menor. Esta misma apreciación se produjo también al dividir la población por sexos. Para evaluar este efecto del alelo G analizamos la asociación de los haplotipos con los parámetros bioquímicos como respuesta al tratamiento. La significación estadística que hallamos en el haplotipo GC sucedió en el día 2 de tratamiento en el que los sujetos que son GC presentaron más folato intraeritrocitario que los AT y los AC como se puede ver en la tabla 25.

rs9340799	rs2234693	Frecuencia	Diferencia	p
A	T	0.55	0.00	-
G	C	0.34	46.48 (17.48 - 75.49)	0.0026*
A	C	0.11	17.23 (-26.48 - 60.94)	0.44

Tabla 25. Asociación de los haplotipos de los SNPs del ESR1 con la diferencia del porcentaje de folato intraeritrocitario el segundo día de tratamiento en la población de estudio. *p<0.05

Al estudiar los haplotipos por sexo en el segundo día de tratamiento, esta diferencia en el grupo no se observó en los hombres pero sí en las mujeres (Tabla 26).

rs9340799	rs2234693	Frecuencia	Diferencia	p
A	T	0.50	0.00	-
G	C	0.35	74.85 (22.9 - 126.79)	0.0079*
A	C	0.15	52.46 (-9.08 - 114)	0.1

Tabla 26. Asociación de los haplotipos de los SNPs del ESR1 con la diferencia el porcentaje de folato intraeritrocitario el segundo día de tratamiento en mujeres. *p<0.05

Basándonos en el trabajo de Schuit y cols. (Schuit et al., 2005) que hallaron menor concentración de estradiol en un grupo de mujeres postmenopáusicas asociado al haplotipo AT, analizamos el efecto de este haplotipo en el metabolismo de los folatos dividiendo los sujetos por sexo y en función de la duplicidad o no del haplotipo AT de la siguiente manera según los dos SNPs estudiados en el ESR1:

- Grupo 0: genotipo AG-CT
- Grupo 1: sujetos AA-CT
- Grupo 2: portadores de dos copias del haplotipo AA-TT

En la tabla 27 se muestra la descriptiva de los parámetros bioquímicos en función de los genotipos de ambos polimorfismos en el grupo de mujeres. En la estadística inferencial comparamos los grupos 0-1, 0-2 y 1-2 con el test de ANOVA y corrección post test de Bonferroni. Las diferencias encontradas se describen a continuación en función del parámetro estudiado:

- a. Folato intraeritrocitario: En mujeres, la comparación 0-1, 1-2 y 0-2 no mostró diferencias significativas, pero sí una tendencia a la baja en el día 2 ya que las del grupo 0 presentaron una mayor variación de folato intraeritrocitario respecto del nivel que los grupos 1 y 2. Ésta misma apreciación no la pudimos hacer en el grupo de hombres, ya que la n fue muy reducida (datos no mostrados).

- b. Folato sérico: en el grupo 0 de mujeres la variación de folato sérico respecto del nivel basal fue menor siendo estadísticamente significativa al 5º día frente al grupo 2 y los días 5 y 10 frente al grupo 1. Tampoco hicimos apreciación alguna en el grupo masculino por el bajo tamaño muestral. (datos no mostrados).

- c. Homocisteína: no hallamos diferencias significativas ni observamos tendencia en función del haplotipo AT entre los grupos en ambos sexos.

Día de tratamiento	Grupo 0 (AG-CT)			Grupo 1 (AA-CT)			Grupo 2 (AA-TT)			
	Media (%)	DE (%)	n	Media (%)	DE (%)	n	Media (%)	DE (%)	n	
iFol	2	80,21	57,28	13	43,53	65,13	5	32,98	72,96	3
	5	193,30	89,89	12	136,76	65,50	5	203,93	49,09	3
	10	249,15	115,74	13	240,83	106,75	3	258,70	20,65	2
	30	430,76	182,90	13	505,46	182,46	5	470,25	101,39	3
	60	139,63	69,65	10	137,17	93,29	4	276,07	0,00	1
sFol	2	116,89	97,15	13	167,26	127,78	5	232,55	54,81	3
	5	227,74*[§]	128,97	10	696,48*	652,01	5	491,39[§]	179,28	3
	10	329,75*	263,49	13	808,77*	965,46	5	739,79	461,33	2
	30	321,79	178,30	13	530,96	336,62	5	461,86	150,79	3
	60	0,82	45,39	10	28,20	72,51	4	8,08	0,00	1
Hcy	2	-27,45	12,48	13	-41,32	9,89	5	-21,49	19,69	3
	5	-36,43	15,80	12	-39,06	24,05	5	-21,53	7,53	3
	10	-40,81	14,14	13	-40,72	20,56	5	-40,42	9,29	2
	30	-42,23	15,82	13	-50,23	18,82	5	-35,96	12,85	3
	60	-30,26	14,50	10	-40,38	28,01	4	-35,64	0,00	1

Tabla 27: Descriptiva de los parámetros bioquímicos en función del haplotipo AT en el grupo de mujeres. *p<0.05 al comparar grupo 0 vs 1; [§]p<0.05 al comprar grupo 0 vs grupo 2

Al incluir en el grupo 0 las no portadoras del haplotipos AT (AGCC+GGCC) la descriptiva incrementa en 3 el número de mujeres de la clasificación inicial de grupo 0. Esta combinación hace que se pierda la significación con la clasificación inicial tal y como describe Schuit, que considera el haplotipo AT el “haplotipo de riesgo”.

4.7.4. MTHFD1 rs2236225 (c. 1958G>A)

No obtuvimos diferencias significativas al comparar en nuestro grupo los genotipos AG-GG con los AA en folatos intraeritrocitario y sérico y Hcy durante los diferentes días de tratamiento y al mes de acabar el mismo. Tampoco se obtuvieron en el grupo de hombres, como se muestra en las tabla 28. En el quinto día de tratamiento, en las mujeres AA el folato sérico fue significativamente superior respecto al basal que en las AG-GG, aunque dicha tendencia se manifiesta durante todo el periodo de tratamiento.

a.Total

	Día de tratamiento	AG-GG			AA					
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	79,99	57,7	27	91,46	80,13	13	-11,48	0,3	> 0,05
	5	191,7	71,17	25	148,92	55,35	12	42,78	1,09	> 0,05
	10	264,56	99,29	21	232,98	71,75	12	31,59	0,78	> 0,05
	30	479,3	217,35	24	395,44	130,12	13	83,86	2,18	> 0,05
	60	138,02	93,54	16	207,91	45,16	7	-69,89	1,38	> 0,05
sFol	2	113,25	96,03	26	164,93	114,58	13	-51,68	0,44	> 0,05
	5	266,38	149,85	24	513,32	557,46	8	-246,9	1,73	> 0,05
	10	384,15	281,61	25	549,07	677,26	12	-164,9	1,35	> 0,05
	30	490,78	620,12	25	408,07	261,74	13	82,71	0,69	> 0,05
	60	28,99	105,94	20	12,26	56,44	11	16,73	0,13	> 0,05
Hcy	2	-25,63	11,23	27	-29,46	14,53	13	3,83	0,72	> 0,05
	5	-30,57	17,9	25	-37,29	13,25	12	6,72	1,22	> 0,05
	10	-39,58	17,54	25	-40,77	12,41	13	1,19	0,22	> 0,05
	30	-43,85	17,25	25	-44,7	11,73	13	0,85	0,16	> 0,05
	60	-26,01	18,32	20	-36,59	17	11	10,58	1,8	> 0,05

b. Hombres

	Día de tratamiento	AG-GG			AA					
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	94,9	55,73	10	81,68	71,93	7	1,31	0,03	> 0,05
	5	189,59	53,46	10	143,99	39,39	7	7,05	0,18	> 0,05
	10	279,78	67,62	8	198,59	64,24	7	28,49	0,71	> 0,05
	30	414,98	174,34	7	345,33	126,44	7	26,87	0,66	> 0,05
	60	103,94	81,6	4	156,63	47,38	2	-35,13	0,5	> 0,05
sFol	2	55,9	55,41	9	131,39	84,59	7	-75,5	0,94	> 0,05
	5	226,11	121,23	9	213,51	111,56	5	12,59	0,14	> 0,05
	10	327,91	195,37	10	343,55	256,67	6	-15,64	0,19	> 0,05
	30	444,54	306,7	8	295,41	89,3	7	149,1	1,81	> 0,05
	60	15,1	62,77	8	-2,2	31,71	6	17,29	0,2	> 0,05
Hcy	2	-23,26	9,52	10	-21,91	10,97	7	-1,35	0,17	> 0,05
	5	-30	19,41	10	-30,74	9,94	7	0,74	0,09	> 0,05
	10	-40,03	21,7	10	-37,38	10,76	7	-2,66	0,33	> 0,05
	30	-48,67	21,79	8	-39,47	4,85	7	-9,2	1,08	> 0,05
	60	-23,64	23,13	8	-27,82	15,42	6	4,18	0,47	> 0,05

Tabla 28. (continúa en la siguiente página)

c. Mujeres

	Día de tratamiento	AG-GG			AA			Diferencia	t	p
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n			
iFol	2	71,21	58,67	17	102,88	94,4	6	-31,67	0,53	> 0,05
	5	193,1	82,71	15	155,82	77,42	5	37,29	0,58	> 0,05
	10	255,2	116,26	13	281,13	54,77	5	-25,93	0,39	> 0,05
	30	505,79	232,28	17	453,91	117,6	6	51,88	0,87	> 0,05
	60	149,38	97,73	12	228,42	25,63	5	-79,05	1,18	> 0,05
sFol	2	143,61	100,23	17	204,05	139,68	6	-60,44	0,3	> 0,05
	5	290,54	163,79	15	1012,99	680,84	3	-722,5	2,69	< 0,05*
	10	421,64	328,09	15	754,59	917,52	6	-332,9	1,62	> 0,05
	30	512,55	730,82	17	539,52	341,1	6	-26,97	0,13	> 0,05
	60	38,25	129,01	12	29,61	77,57	5	8,64	0,04	> 0,05
Hcy	2	-27,03	12,18	17	-38,27	13,75	6	11,24	1,61	> 0,05
	5	-30,95	17,51	15	-46,47	12,42	5	15,52	2,05	> 0,05
	10	-39,28	14,97	15	-44,74	14	6	5,46	0,77	> 0,05
	30	-41,58	14,88	17	-50,8	14,81	6	9,22	1,32	> 0,05
	60	-27,59	15,23	12	-47,11	13,12	5	19,52	2,5	> 0,05

Tabla 28. Comparación de los parámetros bioquímicos en función del MTHFD1 rs2236225 1958G>A en el grupo total (a.) en hombres (b.) y mujeres (c.). Abreviaturas: iFol, folato intraeritrocitario; sFol, folato sérico; Hcy: Homocisteína, *p<0.05

4.7.5. MTHFR

4.7.5.1. rs1801131 (1298 A>C)

No se detectaron en la población sujetos homocigóticos para el alelo menos frecuente (CC). En los sujetos heterocigóticos (AC) se observó un incremento significativo del folato intraeritrocitario respecto del nivel basal en el último día de tratamiento respecto a los AA. La comparación de folato sérico y Hcy entre los sujetos AA y AC no mostró diferencias significativas. Al dividir la población por género no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre hombres en folato intraeritrocitario y Hcy pero sí en el porcentaje folato sérico el décimo día de tratamiento respecto del nivel basal, siendo significativamente superior en los hombres con el genotipo salvaje de este polimorfismo. Además se aprecia que en todos los días de tratamiento los hombres AC mostraron menor folato sérico que los

AA. En las mujeres no hubo diferencias significativas entre los genotipos del SNP A1298C de la MTHFR (Tabla 29).

a.Total										
	AA				AC					
	Día de tratamiento	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	64,65	66,99	27	111,09	49,49	17	46,44	1,33	> 0,05
	5	179,44	86,72	26	183,67	51,22	14	4,23	0,11	> 0,05
	10	249,64	111,47	23	270,24	88,37	13	20,6	0,53	> 0,05
	30	419,78	171,89	25	516,16	206,98	15	96,37	2,61	< 0,05
	60	130,84	81,87	13	167,11	96,53	12	36,27	0,8	> 0,05
sFol	2	140	104,44	26	117,27	103,58	17	-22,73	0,21	> 0,05
	5	407,66	359,97	23	205,71	80,34	13	-201,9	1,71	> 0,05
	10	506,8	507,97	25	351,29	291,69	16	-155,5	1,43	> 0,05
	30	439,94	265,44	25	531,23	755,79	16	91,29	0,84	> 0,05
	60	19,79	63,88	20	27,32	125,81	14	7,53	0,06	> 0,05
Hcy	2	-27,55	11,91	27	-28,29	12,85	17	-0,74	0,15	> 0,05
	5	-33,26	17,1	26	-33,68	15,26	14	-0,42	0,08	> 0,05
	10	-40,84	15,44	25	-39,91	16,17	16	0,93	0,18	> 0,05
	30	-44,02	18,18	25	-47,48	11,32	16	-3,46	0,69	> 0,05
	60	-30,11	19,76	20	-29,68	16,95	14	0,42	0,08	> 0,05
b. Hombres										
	AA				AC					
	Día de tratamiento	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	91,12	67,47	13	75,97	52,09	6	-15,15	0,27	> 0,05
	5	180,37	84,55	13	167,56	46,28	5	-12,8	0,21	> 0,05
	10	274,86	127,77	11	231,79	29,34	5	-43,08	0,7	> 0,05
	30	396,5	175,09	11	426,73	137,49	4	30,23	0,46	> 0,05
	60	129,56	81,51	3	78,3	54,93	3	-51,26	0,55	> 0,05
sFol	2	114,74	91,08	12	54,14	60,93	6	-60,6	0,64	> 0,05
	5	290,83	198,83	11	232,51	56,92	5	-58,32	0,57	> 0,05
	10	452,34	285,6	12	194,31	139,45	6	-258	2,72	<0,05*
	30	446,27	298,95	11	401,58	202,17	5	-44,69	0,44	> 0,05
	60	33,97	75,47	10	-20,68	30,59	5	-54,65	0,53	> 0,05
Hcy	2	-23,33	6,59	13	-27,72	13,73	6	-0,88	0,12	> 0,05
	5	-33,49	13,97	13	-26,72	19,36	5	-10,83	1,35	> 0,05
	10	-41,53	15,67	12	-36,96	21,03	6	-4,71	0,63	> 0,05
	30	-45,27	17,73	11	-44,79	15,36	5	-3,92	0,5	> 0,05
	60	-27,26	19,54	10	-19,34	17,65	5	-16,08	2	> 0,05

Tabla 29. (continúa en la siguiente página)

c. Mujeres

	AA				AC				Diferencia	t	p
	Día de tratamiento	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n				
iFol	2	40,08	58,51	14	130,25	37,66	11	90,18	1,91	> 0,05	
	5	178,52	92,28	13	192,62	54,23	9	14,1	0,28	> 0,05	
	10	226,52	93,76	12	294,28	105,74	8	67,75	1,27	> 0,05	
	30	438,08	173,63	14	548,68	223,48	11	110,6	2,35	> 0,05	
	60	131,22	86,37	10	196,72	90,09	9	65,5	1,22	> 0,05	
sFol	2	161,66	113,42	14	151,71	107,78	11	-9,95	0,06	> 0,05	
	5	514,75	443,92	12	188,96	91,55	8	-325,8	1,7	> 0,05	
	10	557,07	660	13	445,48	323,59	10	-111,6	0,63	> 0,05	
	30	434,97	247,52	14	590,16	910,09	11	155,2	0,92	> 0,05	
	60	5,61	49,72	10	53,99	151,69	9	48,38	0,25	> 0,05	
Hcy	2	-31,46	14,46	14	-28,6	13,02	11	2,86	0,45	> 0,05	
	5	-33,03	20,34	13	-37,55	11,98	9	-4,52	0,66	> 0,05	
	10	-40,2	15,82	13	-41,68	13,46	10	-1,48	0,22	> 0,05	
	30	-43,04	19,13	14	-48,7	9,62	11	-5,67	0,88	> 0,05	
	60	-32,95	20,6	10	-35,43	14,39	9	-2,48	0,34	> 0,05	

Tabla 29. Comparación de los parámetros bioquímicos en función del MTHFR rs1801131, 1298 A>C en el grupo total (a.) en hombres (b.) y mujeres (c.). Abreviaturas: iFol, folato intraeritrocitario; sFol, folato sérico; Hcy: Homocisteína, *p<0.05

4.7.5.2. rs1801133 (677C>T)

Encontramos diferencias significativas en el grupo de hombres, en Hcy el día 5 y 60 y en Fol ser en el día 30: en el grupo de los CT-TT fue mayor el descenso de la Hcy en porcentaje respecto del nivel basal y el aumento de folato sérico significativamente mayor en el último día de tratamiento (día 30). Otra apreciación a la vista de los resultados es que en los hombres CT-TT el aumento de folato intraeritrocitario fue menor que en los que tienen el genotipo CC hasta el día 30, en el que esta tendencia se invierte. Esto en mujeres no sucedió así, ya que las CT-TT mantuvieron folato intraeritrocitario con un aumento en porcentaje del nivel basal por encima durante todo el tratamiento y al mes del mismo. Las diferencias halladas al dividir la población por sexos no se aprecian al comparar los genotipos en el grupo (Tabla 30).

a.Total

CC					CT-TT					
Día de tratamiento	Media (%basal)	DE	n		Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	92,42	61,47	15	72,78	68,16	32	-19,65	0,55	> 0,05
	5	190,94	57,68	15	169,7	82,1	28	-21,24	0,58	> 0,05
	10	260,59	107,63	11	251,11	98,59	28	-9,48	0,23	> 0,05
	30	429,34	181,17	12	449,43	193,63	31	20,09	0,52	> 0,05
	60	119,34	88,13	9	163,63	83,88	18	44,29	0,95	> 0,05
sFol	2	130,75	115,22	14	135,34	96,47	33	4,58	0,04	> 0,05
	5	260,46	126	14	378,64	352,27	25	118,2	1,08	> 0,05
	10	297,36	235,94	13	505,25	473,49	31	207,9	1,93	> 0,05
	30	293,41	147,12	13	555,4	569,95	32	262	2,44	> 0,05
	60	-11,07	27,28	12	43,28	106,69	26	54,35	0,48	> 0,05
Hcy	2	-26,71	14,14	15	-26,81	12,17	32	-0,1	0,02	> 0,05
	5	-26,02	16,75	15	-36,45	14,47	28	-10,43	2,16	> 0,05
	10	-34,93	17,07	13	-42,37	14,09	31	-7,44	1,49	> 0,05
	30	-39,79	18,64	13	-46,98	13,61	31	-7,19	1,45	> 0,05
	60	-21,57	19,74	12	-33,97	15,93	25	-12,4	2,34	> 0,05

b. Hombres

CC					CT-TT					
Día de tratamiento	Media (%basal)	DE	n		Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	107,4	52,62	7	64,63	69,03	15	-42,77	0,93	> 0,05
	5	197,53	59,12	7	155,63	75,81	14	-41,9	0,9	> 0,05
	10	288,15	74,62	5	241,75	108,06	14	-46,4	0,89	> 0,05
	30	372,57	185,57	4	387,55	154,06	14	14,98	0,26	> 0,05
	60	71,05	59,15	3	144,74	55,88	5	73,69	1,01	> 0,05
sFol	2	55,75	60,29	6	131,04	89,91	15	75,29	0,83	> 0,05
	5	221,42	137,13	7	327,42	178,23	11	106	1,16	> 0,05
	10	235,42	149,32	7	432,44	288,64	13	197	2,23	> 0,05
	30	203,5	126,84	5	538,84	307,25	14	335,3	3,41	< 0,01*
	60	-24,46	27,05	6	48,17	82,34	12	72,63	0,77	> 0,05
Hcy	2	-25,33	12,55	7	-23,66	6,16	10	1,67	0,25	> 0,05
	5	-18,41	12,27	7	-38,77	9,15	10	-20,36	3,02	< 0,05*
	10	-29,98	18,54	7	-46,74	11,47	9	-16,76	2,43	> 0,05
	30	-36,23	22,02	5	-47,7	13,44	9	-11,48	1,5	> 0,05
	60	-12,21	22,63	6	-33,14	9,43	7	-20,93	2,75	< 0,05*

Tabla 30. (continúa en la siguiente página)

c. Mujeres

	Día de tratamiento	CC			CT-TT					
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	79,32	69,01	8	79,96	68,66	17	0,65	0,01	> 0,05
	5	185,18	59,80	8	183,77	88,46	14	-1,4	0,03	> 0,05
	10	237,62	131,62	6	260,48	91,22	14	22,86	0,38	> 0,05
	30	457,73	184,55	8	500,39	211,9	17	42,66	0,81	> 0,05
	60	143,49	94,49	6	170,9	93,39	13	27,41	0,45	> 0,05
sFol	2	187,01	116,71	8	143,29	105,55	17	-43,71	0,24	> 0,05
	5	299,51	109,7	7	430,16	464,21	13	130,7	0,66	> 0,05
	10	369,63	308,56	6	557,59	591,99	17	188	0,94	> 0,05
	30	349,6	136,12	8	575,56	742,46	17	226	1,25	> 0,05
	60	2,33	21,78	6	40,62	131,98	13	38,3	0,18	> 0,05
Hcy	2	-27,91	16,16	8	-31,23	12,31	18	-3,32	0,5	> 0,05
	5	-32,68	17,99	8	-35,21	17,06	15	-2,53	0,37	> 0,05
	10	-40,71	14,58	6	-40,94	14,52	18	-0,23	0,03	> 0,05
	30	-42,02	17,43	8	-47,06	14,58	18	-5,05	0,75	> 0,05
	60	-30,93	11,63	6	-34,04	19,96	14	-3,11	0,41	> 0,05

Tabla 30. Comparacion de los parámetros bioquímicos en función del MTHFR rs1801133, 677C>Ten el grupo total (a.) en hombres (b.) y mujeres (c.). Abreviaturas: *iFol*, folato intraeritrocitario; *sFol*, folato sérico; *Hcy*: Homocisteína, * $p < 0.05$

4.7.5.3. Estudio de Haplotipos y genotipos dobles del rs1801133 (677C>T) y rs1801131 (1298 A>C)

Los dos SNPs que estudiamos en la MTHFR deben ser evaluados en su conjunto ya que por su proximidad en el gen y como ha sido publicado en diversos trabajos existe un desequilibrio de ligamiento completo o casi completo entre ambos (Ogino and Wilson, 2003). De hecho en nuestra población no encontramos ningún sujeto con un posible haplotipo TC (CT-CC, TT-AC ni TT-CC) como se refleja en la tabla 31 de genotipos dobles.

Genotipo doble	Grupo		Hombres		Mujeres	
	n	Frecuencia	n	Frecuencia	n	Frecuencia
CC-AA	10	0,23	4	0,21	6	0,24
CC-AC	5	0,11	3	0,16	2	0,08
CT-AA	7	0,16	4	0,21	3	0,12
CT-AC	12	0,27	3	0,16	9	0,36
TT-AA	10	0,23	5	0,26	5	0,20
Total	44	1	19	1	25	1

Tabla 31: Genotipos de la MTHFR para los SNPs: rs1801133 y rs1801131

No tienen representación en nuestra población individuos con 3 ni 4 mutaciones.

Por otro lado, la frecuencia de haplotipos que hayamos en nuestro grupo de estudio se asemeja a los publicado en el meta-análisis de Ogino y Wilson (Ogino and Wilson, 2003).

rs1801133	rs1801131	Grupo (n=44)	Hombres (n=19)	Mujeres (n=25)
T	A	0,45	0,45	0,44
C	A	0,36	0,39	0,34
C	C	0,19	0,16	0,22
T	C	0	0	0

Tabla 32. Frecuencia de haplotipos para los SNPs de la MTHFR, rs1801133 y rs1801131

El análisis del equilibrio de ligamiento en nuestra población mostró un desequilibrio de ligamiento: $D' = 0.9995$, $p < 0.001$.

En la tabla 33 se muestra una descriptiva de los parámetros bioquímicos de la población dividida por género y en función de los genotipos para las mutaciones en posición 1298 y 677 de la MTHFR.

a. Hombres		AA-CC			AC-CC			AA-CT			AC-CT			AA-TT		
Día de tratamiento		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n
iFol	2	116,14	62,14	4	95,75	46,44	3	91,61	47,64	4	56,19	58,75	3	70,7	88,95	5
	5	217,44	60,71	4	171	55,75	3	214,22	106,43	4	162,41	47,56	2	123,63	60,37	5
	10	307,99	95,75	3	258,39	31,35	2	315,74	191,98	4	214,06	7,13	3	209,14	48,6	4
	30	330,77	202,91	3	497,95	0	1	474,43	208,18	4	402,99	158,03	3	367,87	133,76	4
	60	41,64	0	1	85,75	75,5	2	202,6	0	1	63,4	0	1	144,45	0	1
sFol	2	37,74	46,98	3	73,76	76,86	3	164,41	60,59	4	34,52	47,08	3	121,21	109,51	5
	5	214,51	185,94	4	230,63	65,79	3	318,28	69,3	3	235,34	65,38	2	346,58	285,2	4
	10	248,27	163,96	4	218,3	160,61	3	592,79	210,5	4	170,32	145,25	3	515,95	375,04	4
	30	210,7	175,36	3	192,7	49,67	2	417,99	130,55	4	540,83	88,31	3	651,21	384,46	4
	60	-25,65	35,45	3	-23,28	23,85	3	15,11	51,46	4	-16,79	50,54	2	118,74	59,84	3
Hcy	2	-23,88	6,39	4	-27,27	20,04	3	-18,65	4,12	4	-28,16	8,33	3	-26,65	7,14	5
	5	-21,58	15,35	4	-14,19	7,17	3	-36,84	10,82	4	-45,52	14,78	2	-40,34	10,45	5
	10	-34,91	19,53	4	-23,41	18,6	3	-43,49	10,81	4	-50,52	14,43	3	-46,2	17,6	4
	30	-40,36	29,22	3	-30,03	10,13	2	-48,02	10,65	4	-54,63	7,57	3	-46,2	18,16	4
	60	-14,13	32,74	3	-10,3	14,07	3	-32,23	10,46	4	-32,91	15,4	2	-33,76	10,55	3
b. Mujeres		AA-CC			AC-CC			AA-CT			AC-CT			AA-TT		
Día de tratamiento		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n
iFol	2	60,4	70,34	6	136,06	4,12	2	25,54	40,37	3	128,96	41,95	9	24,41	55,14	5
	5	170,42	62,66	6	229,46	13,22	2	170,3	12,95	3	182,09	57,54	7	196,83	163,6	4
	10	187,12	50,29	5	490,11	0	1	240,83	106,75	3	266,3	75,76	7	265,04	128,42	4
	30	402,99	137,84	6	621,95	267,41	2	532,46	217,17	3	532,4	227,71	9	423,55	204,59	5
	60	153,08	102,33	5	95,54	0	1	61,29	54,37	2	209,36	87,35	8	141,41	70,05	3
sFol	2	173,94	124,19	6	226,21	118,91	2	197,62	137,3	3	135,15	105,15	9	125,34	101,29	5
	5	340,42	86,02	5	197,23	115,44	2	647,66	747,05	3	186,2	95,03	6	632,98	503,67	4
	10	401,12	334,03	5	212,15	0	1	1012,49	1298,79	3	471,41	332,02	9	439,77	385,53	5
	30	364,63	144,25	6	304,52	142,3	2	580,83	448,15	3	653,64	1003,93	9	431,86	222,02	5
	60	-0,21	23,35	5	15	0	1	-18,7	60,82	2	58,87	161,41	8	31,52	80,65	3
Hcy	2	-26,81	16,13	6	-31,23	22,32	2	-42,26	7,49	3	-28,02	12,15	9	-30,55	14,35	5
	5	-27,51	18,01	6	-48,2	1,4	2	-31,78	28,82	3	-34,51	11,94	7	-42,26	19,59	4
	10	-37,28	13,34	5	-57,82	0	1	-37,91	17,64	3	-39,88	12,94	9	-44,49	19,5	5
	30	-37,38	17,88	6	-55,94	3,39	2	-48,82	21,63	3	-47,1	9,91	9	-46,35	21,67	5
	60	-31,83	12,77	5	-26,46	0	1	-38,52	31,89	2	-36,55	14,96	8	-31,11	32,18	3

Tabla 33: Parámetros bioquímicos en hombres (a.) y mujeres (b.) según los genotipos dobles de la MTHFR, rs1801133 y rs1801131

4.7.5.4. Comparación de los parámetros bioquímicos en función del número de mutaciones

En hombres se observó una mayor velocidad de entrada de folato intraeritrocitario en el día 2 en función del número de mutaciones, siendo los de mayor velocidad los de cero mutaciones que disminuyen progresivamente respecto a los de 1 y 2 mutaciones. En cuanto a la evolución del tratamiento ese efecto inicial se vio amortiguado al final del tratamiento no observándose diferencias el día 30. En el sentido contrario sucede con el folato sérico ya que los hombres sin mutaciones presentaron menor respuesta al tratamiento en el día 2, frente a los de 1 y 2 mutaciones, quizás debido a que en ese periodo inicial entra más folato al interior del hematíe. Como efecto significativo de estas tendencias se da un aumento estadísticamente significativo de folato sérico el día 30 en sujetos con 2 mutaciones respecto a los de 0 mutaciones. En la Hcy se observa mayor respuesta de descenso de la misma en los sujetos con más mutaciones aunque no llegamos a alcanzar significación estadística, 1 vs 2 mutaciones (Tabla 34).

Hombres

0 mutaciones (AA/CC) vs 1-2 Mutaciones (AA/CT + AC/CC + AC/CT + AA/TT)

	Día de tratamiento	Diferencia	IC 95%	t	p
iFol	2	37,76	-191,8 - 116,3	0,65	> 0,05
	5	52,23	-207,4 - 102,9	0,89	> 0,05
	10	57,34	-232,7 - 118,0	0,87	> 0,05
	30	-92,23	-84,45 - 268,9	1,39	> 0,05
	60	-74,75	-225,1 - 374,6	0,66	> 0,05
sFol	2	-68,16	-250,3 - 386,6	0,57	> 0,05
	5	-77,47	-213,2 - 368,1	0,70	> 0,05
	10	-151,80	-133,7 - 437,2	1,41	> 0,05
	30	-272,70	-49,75 - 595,2	2,24	> 0,05
	60	51,75	-273,2 - 376,7	0,42	> 0,05
Hcy	2	1,07	-24,19 - 22,05	0,12	> 0,05
	5	12,90	-36,19 - 10,39	1,46	> 0,05
	10	6,55	-29,85 - 16,74	0,74	> 0,05
	30	5,86	-32,17 - 20,46	0,59	> 0,05
	60	13,12	-39,64 - 13,40	1,31	> 0,05

0 mutaciones (AA/CC) vs 1 mutación(CT/AA + CC/AC)

	Día de tratamiento	Diferencia	IC 95%	t	p
iFol	2	22,75	-220,4 - 174,9	0,31	> 0,05
	5	21,74	-219,4 - 175,9	0,30	> 0,05
	10	11,37	-234,3 - 211,6	0,14	> 0,05
	30	-148,40	-81,89 - 378,6	1,76	> 0,05
	60	-83,06	-281,0 - 447,1	0,62	> 0,05
sFol	2	-87,82	-188,6 - 364,2	0,86	> 0,05
	5	-59,95	-198,6 - 318,5	0,63	> 0,05
	10	-184,00	-67,02 - 435,1	1,98	> 0,05
	30	-132,20	-151,0 - 415,4	1,26	> 0,05
	60	-24,31	-252,1 - 300,7	0,24	> 0,05
Hcy	2	-1,53	-27,41 - 30,47	0,14	> 0,05
	5	5,55	-34,49 - 23,38	0,52	> 0,05
	10	-0,03	-28,91 - 28,97	0,00	> 0,05
	30	-1,66	-34,30 - 30,99	0,14	> 0,05
	60	8,71	-40,56 - 23,15	0,74	> 0,05

Tabla 34. (continúa en la siguiente página)

0 mutaciones (AA/CC) vs 2 mutaciones (AC/CT + AA/TT)

	Día de tratamiento	Diferencia	IC 95%	t	p
iFol	2	50,88	-202,3 - 100,5	0,91	> 0,05
	5	82,72	-237,7 - 72,23	1,45	> 0,05
	10	96,75	-267,3 - 73,85	1,54	> 0,05
	30	-52,15	-118,5 - 222,7	0,83	> 0,05
	60	-62,29	-240,5 - 365,1	0,56	> 0,05
sFol	2	-50,96	-333,6 - 435,5	0,36	> 0,05
	5	-94,99	-271,7 - 461,7	0,70	> 0,05
	10	-119,60	-236,5 - 475,6	0,91	> 0,05
	30	-393,20	1,213 - 785,2	2,71	< 0,05*
	60	-90,18	-324,7 - 505,0	0,59	> 0,05
Hcy	2	3,34	-28,74 - 22,07	0,35	> 0,05
	5	20,25	-46,25 - 5,755	2,10	> 0,05
	10	13,14	-39,14 - 12,87	1,36	> 0,05
	30	9,45	-38,08 - 19,17	0,89	> 0,05
	60	19,30	-49,59 - 11,00	1,72	> 0,05

1 mutación (AA/CT + AC/CC) vs 2 mutaciones (AC/CT + AA/TT)

	Día de tratamiento	Diferencia	IC 95%	t	p
iFol	2	28,13	-166,8 - 110,6	0,54	> 0,05
	5	60,98	-204,2 - 82,26	1,14	> 0,05
	10	85,38	-234,5 - 63,71	1,54	> 0,05
	30	96,22	-253,1 - 60,69	1,64	> 0,05
	60	20,78	-265,4 - 223,9	0,23	> 0,05
sFol	2	36,86	-306,4 - 232,7	0,36	> 0,05
	5	-35,04	-265,7 - 335,7	0,31	> 0,05
	10	64,47	-342,9 - 213,9	0,62	> 0,05
	30	-261,00	-28,75 - 550,8	2,40	> 0,05
	60	-65,87	-239,1 - 370,8	0,58	> 0,05
Hcy	2	4,87	-23,48 - 13,75	0,70	> 0,05
	5	14,69	-33,92 - 4,530	2,04	> 0,05
	10	13,16	-32,39 - 6,060	1,82	> 0,05
	30	7,80	-27,81 - 12,21	1,04	> 0,05
	60	10,59	-31,65 - 10,47	1,34	> 0,05

Tabla 34. (continúa en la siguiente página)

1 mutación (AA/CT + AC/CC)

	Día de tratamiento	Diferencia	IC 95%	t	p
iFol	2	-4,14	-287,3 - 279,0	0,04	> 0,05
	5	-43,22	-239,9 - 326,4	0,44	> 0,05
	10	57,36	-263,7 - 378,4	0,51	> 0,05
	30	-23,52	-438,0 - 391,0	0,16	> 0,05
	60	116,90	-337,2 - 570,9	0,74	> 0,05
sFol	2	90,64	-149,4 - 330,7	1,06	> 0,05
	5	87,65	-169,0 - 344,3	0,96	> 0,05
	10	374,50	134,4 - 614,5	4,38	<0,01*
	30	225,30	-46,91 - 497,5	2,32	> 0,05
	60	38,38	-201,7 - 278,4	0,45	> 0,05
Hcy	2	-8,62	-17,24 - 34,49	0,93	> 0,05
	5	22,65	-48,51 - 3,214	2,45	> 0,05
	10	20,09	-45,95 - 5,777	2,17	> 0,05
	30	17,99	-47,32 - 11,34	1,72	> 0,05
	60	21,94	-47,80 - 3,927	2,37	> 0,05

2 mutaciones: AC/CT vs AA/TT

	Día de tratamiento	Diferencia	IC 95%	t	p
iFol	2	-14,51	-169,4 - 198,5	0,22	> 0,05
	5	38,78	-249,5 - 172,0	0,52	> 0,05
	10	4,92	-197,3 - 187,5	0,07	> 0,05
	30	35,12	-227,5 - 157,3	0,52	> 0,05
	60	81,05	-275,2 - 437,3	0,64	> 0,05
sFol	2	-86,69	-388,1 - 561,5	0,51	> 0,05
	5	-111,20	-451,8 - 674,3	0,55	> 0,05
	10	-345,60	-150,9 - 842,2	1,95	> 0,05
	30	-110,40	-386,2 - 606,9	0,62	> 0,05
	60	-135,50	-458,0 - 729,0	0,64	> 0,05
Hcy	2	-1,51	-24,55 - 27,58	0,16	> 0,05
	5	-5,18	-24,68 - 35,03	0,48	> 0,05
	10	-4,32	-22,94 - 31,58	0,44	> 0,05
	30	-8,43	-18,82 - 35,69	0,87	> 0,05
	60	0,85	-33,43 - 31,73	0,07	> 0,05

Tabla 34: Comparación de los parámetros bioquímicos en función del número de mutaciones en hombres

Las comparaciones llevadas a cabo de los parámetros bioquímicos en mujeres según el número de mutaciones de la MTHFR no mostraron diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados). Las tendencias que observamos

en el grupo masculino en las mujeres no existen e incluso parecen estar invertidas. Por tanto podemos decir que observamos un dimorfismo sexual en la respuesta al tratamiento con folatos entre hombres y mujeres siendo el hombre más sensible a los cambios. Este efecto puede estar mediado por el sugerido efecto estrogénico sobre el metabolismo de los folatos principalmente en mujeres.

4.7.6. MTRR rs1801394 (c.66A>G)

Los sujetos de genotipo homocigoto salvaje presentaron significativamente menor incremento porcentual de folato intraeritrocitario respecto del nivel basal el último día de tratamiento. Esta diferencia no se obtuvo entre los géneros (Tabla 35)

	Día de tratamiento	AA			AG-GG					
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	84,14	63,23	10	85,55	67,67	30	-1,41	0,03	> 0,05
	5	172,18	48,59	10	189,92	83,02	27	-17,75	0,43	> 0,05
	10	217,35	55,7	9	285,01	107,92	24	-67,65	1,55	> 0,05
	30	362,87	89,3	10	505,92	206,4	27	-143	3,45	<0,01*
	60	165,17	83,65	6	150,63	88,71	17	14,54	0,27	> 0,05
sFol	2	131,42	120,9	9	136,08	99,18	30	-4,65	0,04	> 0,05
	5	239,55	135,14	8	354,74	352,88	24	-115,2	0,81	> 0,05
	10	326,25	279,69	9	476,28	475,98	28	-150	1,13	> 0,05
	30	323,93	173,34	10	521,95	591,11	28	-198	1,55	> 0,05
	60	-1,74	32,17	9	35,56	103,53	22	-37,3	0,27	> 0,05
Hcy	2	-24,55	11,2	10	-27,15	12,52	30	2,6	0,45	> 0,05
	5	-32,33	10,17	10	-32,15	18,5	27	0,18	0,03	> 0,05
	10	-41,96	9,53	10	-39,63	17,93	28	-2,34	0,4	> 0,05
	30	-43,13	12,74	10	-45,91	16,33	28	2,79	0,48	> 0,05
	60	-29,03	16,11	9	-30	19,69	22	0,97	0,15	> 0,05

Tabla 35. (continúa en la siguiente página)

b. Hombres

	Día de tratamiento	AA			AG-GG					
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	74,78	69,21	5	99,53	60,94	12	-24,75	0,46	> 0,05
	5	167,56	31,45	5	192,51	80,05	12	-24,95	0,46	> 0,05
	10	236,28	39,57	4	286,46	114,86	11	-50,18	0,85	> 0,05
	30	343,35	76,79	5	452,5	188,89	9	-109,2	1,94	> 0,05
	60	190,13	0	1	107,77	71,19	5	82,36	0,75	> 0,05
sFol	2	111,84	125,52	4	81,13	59,98	12	30,71	0,35	> 0,05
	5	184,06	105,52	4	235,63	117,44	10	-51,57	0,57	> 0,05
	10	270,85	149,7	4	318,83	183,91	12	-47,98	0,55	> 0,05
	30	365,65	170,77	5	377,26	273,57	10	-11,61	0,14	> 0,05
	60	-2,56	43,66	4	12,59	54,78	10	-15,15	0,17	> 0,05
Hcy	2	-16,34	4,63	5	-26,14	9,8	12	-9,8	1,11	> 0,05
	5	-29,95	9,37	5	-31,01	18,14	12	1,06	0,12	> 0,05
	10	-42,91	11,91	5	-39,43	20,21	12	-3,48	0,39	> 0,05
	30	-45,05	9,76	5	-45,54	19,62	10	0,48	0,05	> 0,05
	60	-29,27	18,21	4	-25,66	21,79	10	-3,62	0,37	> 0,05

c. Mujeres

	Día de tratamiento	AA			AG-GG					
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	93,51	63,13	5	76,23	71,97	18	17,28	0,28	> 0,05
	5	176,79	65,34	5	187,86	88,05	15	-11,06	0,18	> 0,05
	10	202,21	66,22	5	283,77	106,42	13	-81,56	1,28	> 0,05
	30	382,4	105,33	5	532,63	214,7	18	-150,2	2,45	> 0,05
	60	160,18	92,52	5	168,49	91,76	12	-8,31	0,13	> 0,05
sFol	2	147,09	129,33	5	172,71	104,41	18	-25,62	0,12	> 0,05
	5	295,03	152,53	4	439,82	438,24	14	-144,8	0,59	> 0,05
	10	370,56	366,22	5	594,36	590,17	16	-223,8	1,01	> 0,05
	30	282,21	184,63	5	602,33	704,39	18	-320,1	1,46	> 0,05
	60	-1,09	25,26	5	54,7	130,87	12	-55,79	0,24	> 0,05
Hcy	2	-32,77	9,6	5	-27,82	14,28	18	-4,95	0,62	> 0,05
	5	-34,7	11,44	5	-33,06	19,37	15	-1,64	0,2	> 0,05
	10	-41,02	7,77	5	-39,78	16,7	16	-1,24	0,15	> 0,05
	30	-41,2	16,14	5	-46,12	14,82	18	4,92	0,62	> 0,05
	60	-28,84	16,44	5	-33,62	17,9	12	4,78	0,57	> 0,05

Tabla 35. Comparación de los parámetros bioquímicos en función del rs1801394, 66A>G de la MTRR en el grupo total (a.) en hombres (b.) y mujeres (c.). Abreviaturas: *iFol*, folato intraeritrocitario; *sFol*, folato sérico; *Hcy*: Homocisteína, * $p < 0.05$

4.7.7. RFC1 rs1051266 (c.80A>G)

Los individuos portadores de uno ó dos alelos variantes mostraron un porcentaje de folato intraeritrocitario respecto del nivel basal significativamente mayor que homocigotos salvajes. Ésta diferencia se observó el día 30 del tratamiento en el grupo y al dividir la población por sexos, en los hombres.

a.Total										
	Día de tratamiento	AA			AG-GG					
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	84,95	76,12	13	79,58	61,78	32	-5,36	0,14	> 0,05
	5	182,57	60,87	12	176,4	80,92	30	-6,17	0,16	> 0,05
	10	243,15	101,53	12	261,36	104,24	25	18,21	0,46	> 0,05
	30	374,66	161,86	12	480,06	196,49	29	105,4	2,7	< 0,05*
	60	132,52	112,11	6	158,05	79,5	20	25,53	0,48	> 0,05
sFol	2	116,26	91,12	13	143,54	105,95	31	27,28	0,25	> 0,05
	5	284,39	201,79	11	353,48	336,28	26	69,1	0,57	> 0,05
	10	395,77	298,07	12	472,89	483,89	29	77,12	0,67	> 0,05
	30	295,93	158,81	12	532,19	578,33	30	236,3	2,05	> 0,05
	60	-17,4	38,96	8	35,65	98,35	27	53,05	0,39	> 0,05
Hcy	2	-24,01	12,55	13	-28,62	12,21	32	-4,61	0,9	> 0,05
	5	-26,57	13,03	12	-35,46	16,69	30	-8,89	1,67	> 0,05
	10	-37,66	12,48	12	-41,2	16,74	30	-3,54	0,67	> 0,05
	30	-41,46	16,53	12	-46,18	15,53	30	-4,713	0,89	> 0,05
	60	-28,52	23,17	8	-31,18	17,05	27	-2,664	0,42	> 0,05

Tabla 36. (continúa en la siguiente página)

b. Hombres

	AA				AG-GG					
	Día de tratamiento	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	87,29	77,92	6	80,96	61,22	14	-6,34	0,14	> 0,05
	5	156,73	63,04	6	177,73	78,81	14	21	0,45	> 0,05
	10	212,88	110,91	6	282,01	99,85	11	69,13	1,42	> 0,05
	30	259,22	153,32	5	450,27	136,78	11	191	3,7	<0,01*
	60	82,38	57,62	2	141,74	67,13	5	59,36	0,74	> 0,05
sFol	2	82,77	64,35	6	117,88	93,96	13	35,11	0,38	> 0,05
	5	222,48	185,67	5	293,15	155,06	12	70,66	0,71	> 0,05
	10	362,83	241,71	6	382,44	281,65	12	19,62	0,21	> 0,05
	30	257,07	144,94	5	470,86	284,59	12	213,8	2,13	> 0,05
	60	-0,4	43,31	4	23,58	69,84	12	23,99	0,22	> 0,05
Hcy	2	-21,8	4,85	6	-24,42	11,16	14	-2,62	0,35	> 0,05
	5	-26,88	14,74	6	-32,44	15,2	14	-5,558	0,74	> 0,05
	10	-33,81	15,56	6	-41,99	17,78	13	-8,178	1,07	> 0,05
	30	-35,02	16,23	5	-47,46	15,61	12	-12,44	1,51	> 0,05
	60	-20,26	24,46	4	-28,38	17,41	12	-8,118	0,91	> 0,05

c. Mujeres

	AA				AG-GG					
	Día de tratamiento	Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	82,93	80,74	7	78,52	63,96	18	-4,42	0,08	> 0,05
	5	208,41	50,74	6	175,24	85,29	16	-33,17	0,56	> 0,05
	10	273,42	90,45	6	245,14	108,39	14	-28,28	0,47	> 0,05
	30	457,11	115,44	7	498,27	227,29	18	41,15	0,75	> 0,05
	60	157,59	131,63	4	163,49	84,64	15	5,9	0,09	> 0,05
sFol	2	144,96	105,23	7	157,28	108,78	25	12,32	0,07	> 0,05
	5	335,97	216,41	6	384,43	379,46	20	48,46	0,27	> 0,05
	10	428,71	366,65	6	508,56	532,57	23	79,84	0,45	> 0,05
	30	323,69	173,41	7	503,25	620,06	25	179,6	1,08	> 0,05
	60	-34,39	29,92	4	28,53	109,91	19	62,92	0,29	> 0,05
Hcy	2	-25,89	16,92	7	-31,88	12,29	18	-5,98	0,85	> 0,05
	5	-26,26	12,48	6	-38,11	17,94	16	-11,85	1,57	> 0,05
	10	-41,52	8,05	6	-40,6	16,43	17	0,91	0,12	> 0,05
	30	-46,07	16,32	7	-45,32	15,87	18	0,75	0,11	> 0,05
	60	-36,77	21,74	4	-33,42	17,01	15	3,35	0,38	> 0,05

Tabla 36. Comparación de los parámetros bioquímicos en función del rs1051266, 80G>A, del RFC1 en el grupo total (a.), en hombres (b.) y mujeres (c.). Abreviaturas: iFol, folato intraeritrocitario; sFol, folato sérico; Hcy: Homocisteína, *p<0.05



4.7.8. TCN2 rs1801198 (c.776C>G)

Los hombres homocigotos para el alelo mutado presentan significativamente menor porcentaje de folato sérico respecto del nivel basal (Tabla 37).

a.Total										
	Día de tratamiento	CC-CG			GG					
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	75,54	66,04	36	100,58	60,72	9	25,04	0,58	> 0,05
	5	177,62	82,48	32	182,45	49,31	9	4,84	0,11	> 0,05
	10	258,95	100,04	29	239,19	116,87	8	-19,76	0,43	> 0,05
	30	458,3	189,02	33	414,55	207,87	8	-43,76	0,96	> 0,05
	60	162,63	81,24	20	96,12	95,85	6	-66,52	1,24	> 0,05
sFol	2	137,58	106,42	35	109,71	86,96	9	-27,87	0,22	> 0,05
	5	379,14	328,95	28	179,31	117,68	8	-199,8	1,49	> 0,05
	10	475,28	481,9	33	309,96	136,07	9	-165,3	1,32	> 0,05
	30	533,38	549,91	33	234,75	111,11	9	-298,6	2,38	> 0,05
	60	33,3	98,65	28	-22,2	26,81	7	-55,5	0,39	> 0,05
Hcy	2	-28	12,3	36	-26,76	11,38	9	-1,25	0,22	> 0,05
	5	-33,49	16,63	32	-32,72	14,87	9	-0,77	0,13	> 0,05
	10	-41,51	15,41	33	-36,92	15,44	9	-4,59	0,79	> 0,05
	30	-46,82	14,15	33	-39,13	20,06	9	-7,69	1,33	> 0,05
	60	-31,81	16,15	28	-22,13	24,46	7	-9,68	1,48	> 0,05
b. Hombres										
	Día de tratamiento	CC-CG			GG					
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	73,31	60,36	16	114,46	77	4	41,15	0,7	> 0,05
	5	173,8	84,08	15	166,12	32,14	4	-7,69	0,13	> 0,05
	10	261,14	115,11	14	231,53	58,51	3	-29,61	0,44	> 0,05
	30	405,14	158,22	13	335,01	213,88	3	-70,13	1,05	> 0,05
	60	134,54	49,86	5	37	6,56	2	-97,54	1,11	> 0,05
sFol	2	103,68	78,78	15	78,83	116,73	4	24,86	0,24	> 0,05
	5	307,86	165,33	13	119,83	53,84	3	188	1,59	> 0,05
	10	377,17	293,77	15	279,88	134,74	4	97,29	0,93	> 0,05
	30	486,8	259,41	13	201,17	130,3	4	285,6	2,7	< 0,05*
	60	25,82	68,4	13	-33,6	15,63	3	59,42	0,5	> 0,05
Hcy	2	-24,62	9,39	16	-25,02	8,56	4	0,4	0,05	> 0,05
	5	-32,71	14,87	15	-27,05	16,46	4	-5,66	0,72	> 0,05
	10	-42,76	16,17	15	-30,35	16,88	4	-12,41	1,58	> 0,05
	30	-49,59	12,53	13	-28,55	17,43	4	-21,04	2,63	> 0,05
	60	-30	14,13	13	-2,37	17,99	3	-27,63	3,09	< 0,05

Tabla 37. (continúa en la siguiente página)

c. Mujeres

	Día de tratamiento	CC-CG			GG			Diferencia	t	p
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n			
iFol	2	77,32	71,77	20	89,48	50,8	5	12,15	0,2	> 0,05
	5	180,98	83,49	17	195,52	60,07	5	14,54	0,23	> 0,05
	10	256,9	87,78	15	243,79	148,72	5	-13,12	0,21	> 0,05
	30	492,86	202,92	20	462,27	212,5	5	-30,59	0,5	> 0,05
	60	172	88,72	15	125,68	108,64	4	-46,32	0,67	> 0,05
sFol	2	163	118,76	20	134,41	56,47	5	28,59	0,14	> 0,05
	5	440,91	420,06	15	215	136,17	5	225,9	1,04	> 0,05
	10	557,04	592,02	18	334,03	147,6	5	223	1,05	> 0,05
	30	563,66	681,44	20	261,62	99,64	5	302	1,44	> 0,05
	60	39,78	121,09	15	-13,66	32,36	4	53,44	0,23	> 0,05
Hcy	2	-30,71	13,85	20	-28,15	14,09	5	-2,56	0,32	> 0,05
	5	-34,18	18,47	17	-37,26	13,46	5	3,08	0,38	> 0,05
	10	-40,47	15,14	18	-42,19	13,6	5	1,72	0,21	> 0,05
	30	-45,01	15,14	20	-47,59	19,37	5	2,58	0,32	> 0,05
	60	-33,37	18,07	15	-36,95	17,24	4	3,58	0,4	> 0,05

Tabla 37. Comparación de los parámetros bioquímicos en función del rs1801198 (776C>G), de la TCN2 en el grupo total (a.), en hombres (b.) y mujeres (c.). Abreviaturas: *iFol*, folato intraeritrocitario; *sFol*, folato sérico; *Hcy*: Homocisteína, * $p < 0.05$

4.7.9. TYMS rs2853542 (C>G, 28bp VNTR 3R)

El alelo G de este polimorfismo mostró un efecto contrario entre sexos que se diluye al valorar el grupo en su conjunto. Por un lado en los hombres portadores del alelo variante G el porcentaje de folato intraeritrocitario fue significativamente menor que los CC en el último día de tratamiento. Lo contrario sucedió en mujeres en las que en las CG el folato intraeritrocitario fue significativamente mayor (Tabla 38)

a.Total										
	Día de tratamiento	CC			CG					
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	71,16	64,91	29	99,21	64,32	16	28,05	0,78	> 0,05
	5	176,75	85,39	27	180,71	54,28	15	3,95	0,11	> 0,05
	10	243,87	102,39	25	279,58	102,21	12	35,7	0,88	> 0,05
	30	429,29	139,99	26	483,73	259,87	15	54,44	1,46	> 0,05
	60	153,28	81,51	15	150,62	96,37	11	-2,66	0,06	> 0,05
sFol	2	131,25	102,67	29	143,65	102,31	15	12,39	0,11	> 0,05
	5	378,39	357,02	23	258,28	162,1	14	-120,1	1,05	> 0,05
	10	441,3	485,18	27	467,7	334,78	14	26,4	0,24	> 0,05
	30	418,94	241,14	27	547,04	792,16	15	128,1	1,17	> 0,05
	60	7,92	50,41	23	53,45	137,25	12	45,53	0,38	> 0,05
Hcy	2	-28,74	13,39	29	-24,64	10,05	16	4,1	0,86	> 0,05
	5	-35,36	14,59	27	-28,54	18,19	15	6,81	1,37	> 0,05
	10	-43,14	15,32	27	-34,88	15,08	15	8,26	1,67	> 0,05
	30	-47,1	15,18	27	-40,75	16,5	15	6,35	1,28	> 0,05
	60	-33,65	17,61	23	-24,68	18,84	12	8,97	1,64	> 0,05

b. Hombres

	Día de tratamiento	CC			CG					
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n	Diferencia	t	p
iFol	2	74,53	57,42	12	95,35	76,45	8	34,28	0,72	> 0,05
	5	172,43	86,47	12	169,93	53,71	8	12,81	0,25	> 0,05
	10	262,12	119,62	10	251,17	91,71	7	87,63	1,53	> 0,05
	30	426,4	153,14	9	344,5	179,13	7	174,7	3,67	<0,01*
	60	85,75	75,5	2	140,39	64,05	5	-4,525	0,08	> 0,05
sFol	2	94,8	84,52	12	127,34	89,84	7	32,54	0,36	> 0,05
	5	269,07	121,22	10	277,07	218,9	7	7,994	0,08	> 0,05
	10	337,88	196,24	11	435,65	351,25	7	97,76	1,05	> 0,05
	30	443,57	230,76	10	357,12	323,06	7	-86,45	0,91	> 0,05
	60	11,17	47,71	10	28,28	88,79	6	17,11	0,17	> 0,05
Hcy	2	-25,44	11,3	12	-20,94	6,14	8	4,495	0,64	> 0,05
	5	-31,9	14,26	12	-29,08	16,67	8	2,823	0,4	> 0,05
	10	-44,62	18,78	11	-32,23	12,2	8	12,39	1,74	> 0,05
	30	-48,43	14,12	10	-37,19	18,09	7	11,24	1,49	> 0,05
	60	-29,46	17,05	10	-21,17	22,15	6	8,289	1,05	> 0,05

Tabla 38. (continúa en la siguiente página)

c. Mujeres

	Día de tratamiento	CC			CG			Diferencia	t	p
		Media (%basal)	DE	n	Media (%basal)	DE	n			
iFol	2	68,79	71,36	17	103,07	54,66	8	34,28	0,69	> 0,05
	5	180,21	87,4	15	193,02	56,36	7	12,81	0,24	> 0,05
	10	231,71	91,53	15	319,35	112,79	5	87,63	1,47	> 0,05
	30	430,82	137,42	17	605,57	266,85	8	174,7	3,53	<0,01*
	60	163,67	79,99	13	159,15	122,89	6	-4,53	0,08	> 0,05
sFol	2	163,37	109,02	16	157,91	116,26	8	-5,46	0,03	> 0,05
	5	462,48	452,81	13	239,49	90,5	7	-223	1,12	> 0,05
	10	533,24	622,93	15	499,76	342,14	7	-33,48	0,17	> 0,05
	30	414,94	257,31	16	713,21	1047,84	8	298,3	1,62	> 0,05
	60	9,09	54,88	12	78,61	179	6	69,52	0,33	> 0,05
Hcy	2	-31,08	14,56	17	-28,34	12,14	8	2,74	0,41	> 0,05
	5	-38,12	14,74	15	-27,93	21,15	7	10,19	1,42	> 0,05
	10	-42,12	13,01	16	-37,91	18,36	7	4,22	0,59	> 0,05
	30	-46,31	16,15	17	-43,86	15,49	8	2,45	0,36	> 0,05
	60	-36,87	18,01	13	-28,18	16,13	6	8,69	1,12	> 0,05

Tabla 38. Comparación de los parámetros bioquímicos en función del rs2853542 (VNTR 3RC>G) de la TYMS en el grupo total (a.), en hombres (b.) y mujeres (c.). Abreviaturas: iFol, folato intraeritrocitario; sFol, folato sérico; Hcy: Homocisteína, *p<0.05



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



5. DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El presente trabajo consiste en un estudio sobre el efecto del tratamiento en el metabolismo de los folatos de dos grupos de jóvenes de distinto sexo, homogéneos en edad con una dosis media-alta de folatos. Se pretende, en primer lugar, observar la respuesta al tratamiento con folínico de toda la población en conjunto; en segundo lugar, detectar el comportamiento diferencial del metabolismo de los folatos entre géneros; en tercer lugar, valorar la respuesta al tratamiento de distintos polimorfismos funcionales seleccionados de los genes implicados en el metabolismo de los folatos y en cuarto lugar observar si existe una respuesta diferencial en función del sexo en relación con los mencionados polimorfismos. Todo ello bajo la hipótesis principal de que existe un dimorfismo sexual en el metabolismo de los folatos que se evidencia ante una respuesta diferencial al tratamiento con folatos y que esta respuesta diferencial puede estar modulada por una distinta gestión hormonal-metabólica, determinada por el sexo y los genes implicados en el eje.

El tratamiento con ácido folínico busca distinguir tres aspectos básicos:

1. La respuesta inmediata entre los días 2 y 5 después de comenzado el tratamiento.
2. Una perspectiva de la evolución del tratamiento durante los 30 días y 30 días después de haber finalizado.
3. El estado final del metabolismo de los folatos valorado en sus distintos analitos para establecer la influencia de los polimorfismos en un sistema donde se ha eliminado el factor dietético por saturación de folatos.

En resumen, este trabajo trata de obviar la edad y los factores de la dieta como coadyuvantes de las variaciones en los niveles de Hcy y folatos, y de esta forma estudiar las diferentes respuestas al tratamiento con ácido folínico entre los dos grupos de jóvenes diferenciados por sexos y el papel de polimorfismos funcionales en el equilibrio final del sistema

5.1. Sobre el grupo de estudio

Es bien conocido el efecto de la edad aparte de la dieta sobre los niveles de Hcy, calculándose un incremento de $1\mu\text{mol/L}$ por cada 25 años de edad (Reyes-Engel et al., 2002). La población de estudio seleccionada fue homogénea en edad y sin patología que pueda introducir un sesgo en nuestro trabajo.

5.2. Sobre el efecto del tratamiento

Los resultados de las concentraciones basales de los parámetros bioquímicos muestran unas desviaciones y unas concentraciones muy semejantes a las que se han estudiado en poblaciones similares. Sólo se diferencian en que en nuestra población no se observa una carencia de folatos intraeritrocitario en mujeres jóvenes, como concluyen otros estudios en poblaciones europeas (Kluijtmans et al., 2003; Al-Tahan et al., 2006). Por otro lado, cabe mencionar cómo las desviaciones estándar en la Hcy van disminuyendo a medida que el tratamiento va desarrollándose, al contrario de los valores de folatos sérico e intraeritrocitario cuyas desviaciones se hacen mayores. Este hecho abunda en calificar a la Hcy como el marcador funcional del equilibrio del sistema. Estos resultados nos llevan a establecer una buena instalación del tratamiento.

A diferencia de la mayoría de trabajos publicados sobre tratamientos con folatos hemos empleado la variación en porcentaje respecto del nivel basal. De esta manera hemos reducido la variabilidad interindividual e igualado a los sujetos ya que no hemos controlado la ingesta de folatos antes del tratamiento.

5.3. Influencia del tratamiento en los niveles sérico e intraeritrocitario de folato

En primer lugar se discutirán los resultados obtenidos en los niveles de folato sérico e intraeritrocitario tanto en el conjunto de la población como en la población dividida por sexos y la relación a los diferentes polimorfismos de los genes estudiados

5.3.1. Población de estudio

En todos los sujetos se observó, como cabía esperar, un incremento del folato sérico durante los días de intervención que se estabilizó en el 10º día de tratamiento y que retornó a niveles basales treinta días después de finalizado el mismo. Sin embargo, cuando se estudian los niveles de folato intraeritrocitario en toda la población, se observa que dichos niveles aumentan progresivamente durante todo el tratamiento y se mantienen aumentados treinta días después de finalizar el mismo. Ya que el folato intraeritrocitario es considerado el depósito de esta vitamina (Lucock et al., 1996; Smulders et al., 2007) y un indicador de las reservas tisulares (*Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline, 1998*), parece ser que el dintel sérico mencionado sería consecuencia de una limitación en la liberación de folatos a la circulación por parte de la célula, más que un problema de absorción o de eliminación metabólica de folatos. En los tejidos periféricos, el 5-metilTHF penetra en el interior de la célula gracias a un sistema de transporte específico. Allí pierde su grupo metilo al cederlo a la Hcy, reacción catalizada por la MTR, enzima que también requiere de la vitamina B₁₂ para su actividad. El THF formado es el sustrato preferente en las reacciones de poliglutamilación en las que la folilpoliglutamato sintasa vuelve a añadir los residuos glutámicos y los folatos quedan retenidos en el interior de la célula, ya que sólo pueden abandonarla si se transforman nuevamente en derivados monoglutámicos (Varela Moreiras, G y Alonso Aperte, E, 2005).

Cabe pensar, si bien no disponemos de argumentos suficientes para confirmarlo, que estos niveles máximos de folatos séricos se corresponderían con los valores óptimos para la correcta utilización de los mismos por parte del resto de estirpes celulares, puesto que las concentraciones intraeritrocitarias no dejan de elevarse durante el periodo de tratamiento y sin embargo los valores de los folatos séricos no sobrepasan el dintel determinado a partir del 10º día de tratamiento.

Las concentraciones de folato intraeritrocitario ascienden progresivamente hasta el último día en el que se administra el ácido fólico y descienden al mes de

finalizado el tratamiento. Este comportamiento nos lleva a deducir que la capacidad de almacenamiento de folatos intracelular supera la capacidad de saturación de la dosis de tratamiento estudiada de 5 mg de ácido folínico. Esta capacidad de almacenamiento se podría explicar desde un punto de vista evolutivo como un mecanismo adaptativo de defensa ante la incapacidad de síntesis de folatos de novo de nuestro organismo y por la abundancia relativa o circunstancial de folatos que el ser humano ha tenido a su disposición a lo largo de la historia. Hay que tener presente que incluso hoy representa la carencia vitamínica más frecuente en la humanidad.

5.3.2. Influencia del sexo

La evolución de los folatos sérico e intraeritrocitario en mujeres presenta distintos patrones: el folato sérico alcanza un plateau en el décimo día de tratamiento mientras que el folato intraeritrocitario asciende hasta el último día. No obtuvimos diferencias estadísticamente significativas en folato sérico entre sexos probablemente debido al bajo número de sujetos pero vemos un patrón diferente, como se explica más adelante. Se halló un efecto similar en el primer estudio realizado sobre la cinética del folato (Heseker and Schmitt, 1987), aunque este trabajo no diferenciaba por sexo la población. Respecto al plateau de folato sérico está descrito en la bibliografía y la mayoría de los trabajos consultados se han realizado en mujeres en edad reproductiva en las que se ha ensayado el efecto de las diferentes pautas de suplementación en la prevención del DTN. Además ocurre de una manera dosis-dependiente aunque en diferentes momentos durante el tratamiento (Lamers et al., 2006; Hao et al., 2008). Venn y colaboradores no alcanzaron el plateau de folato sérico probablemente debido a la baja dosis empleada (100µg/día) (B J Venn et al., 2002) .

El porcentaje de folato sérico alcanzado respecto del nivel basal se estabiliza en mujeres al décimo día de tratamiento, mientras que en los varones no podemos decir que se llega a un máximo pero sí que se aproxima al nivel alcanzado en mujeres aunque más tarde. Las diferencias de folatos séricos tenderían a igualarse entre sexos al final del tratamiento, como si hubiera un dintel sérico diferente de folatos para

ambos. La diferencia entre sexos corresponde al tiempo en el que se alcanza el dintel, y además el descenso de folatos séricos después del tratamiento, es idéntica en ambos sexos.

A medida que avanza el tratamiento, las mujeres presentan mayor porcentaje de folato intraeritrocitario respecto del nivel basal que los hombres al final del tratamiento. Se parte de diferencias no significativas que van incrementándose conforme avanza el tratamiento hasta alcanzar su máxima diferencia al final del mismo. En este estudio no hemos podido alcanzar su punto de almacenamiento máximo ni en hombres ni en mujeres. En el caso de los folatos séricos la regulación debe estar relacionada con la capacidad de almacenamiento tisular y de la liberación intracelular.

El folato intraeritrocitario se utiliza en la práctica clínica como marcador del estatus intracelular de folatos. En la bibliografía está aceptado el almacén de folatos en los hematíes como un indicador de reserva tisular (Lucock et al., 1996; *Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline*, 1998; Smulders et al. 2007). Hay escasa bibliografía sobre la correlación de los marcadores sanguíneos con los niveles tisulares. Un trabajo que data de 1975 compara folato sérico e intraeritrocitario con los niveles de folato en hígado (Wu et al., 1975), el principal lugar de almacenamiento en el organismo (Shenkin A et al., 2006). En el trabajo de Wu y colaboradores directamente midieron folato en biopsia de hígado de pacientes alcohólicos. Tanto el folato sérico como el intraeritrocitario correlacionaron bien con el folato hepático, si bien el intraeritrocitario presentó mejor rendimiento en cuanto a sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y positivo. No obstante, se llevó a cabo en un reducido número de sujetos. Muchos autores coinciden en el uso del folato intraeritrocitario como marcador del status de folatos aunque los expertos reconocen no tener el total conocimiento de si es preferible a usar el folato sérico (Yetley et al., 2011).

La rápida consecución del plateau de folato sérico en mujeres puede ser debido a la necesidad fisiológica aguda de folatos durante el embarazo, que, en una escala

menor, coincide con la rápida reducción de Hcy entre las fases lútea y folicular del ciclo menstrual (J. Tallova et al., 1999).

En el trabajo liderado por Winkels en 2008 se atribuye al menor almacenamiento de folatos intraeritrocitarios en hombres a su mayor masa muscular, por tanto, a un mayor consumo (Winkels et al., 2008). No compartimos este argumento y nos inclinamos por los mayores requerimientos de la mujer para cumplir su función reproductiva.

En definitiva, en ambos sexos no se presenta el mismo comportamiento, no hemos encontrado en la bibliografía este patrón de comportamiento diferencial de los folatos séricos en hombres.

Respecto a la posibilidad de alcanzar un plateau de folatos en el hematíe, el grupo de Lamers no lo consigue tras 24 semanas de tratamiento. Estos autores postulan que a los 120 días de suplementación con folatos los hematíes se regeneran y el contenido de folato intraeritrocitario se incorpora en la siguiente generación de células recién formadas. En los 120 días sucesivos la segunda generación de hematíes se beneficia tanto del suplemento (en su caso el tratamiento duró 168 días) como del folato disponible liberado de la generación anterior (Lamers et al., 2006). Desde el punto de vista farmacocinético se ha visto que el folato intraeritrocitario aumenta lentamente desde que comienza el aporte de folato y podría no alcanzar los niveles de estado estacionario hasta las 35 semanas (Farrell et al., 2013).

Por otro lado al mes de haber finalizado el tratamiento, el folato intraeritrocitario permanece por encima del basal al igual que lo hallado por otros autores (Lamers et al., 2006; Hao et al., 2008) que además han comprobado que la tasa de descenso es también dosis dependiente. Es decir, mayor descenso a mayor dosis administrada.

5.3.3. Efecto de los polimorfismos genéticos en los niveles de folatos

5.3.3.1. ATIC rs2372536 (c.347C>G)

La ATIC cataliza los dos últimos pasos de la síntesis de novo de purinas, tiene doble actividad transformilasa-ciclohidrolasa que utiliza 10-formilTHF. El polimorfismo rs2372536 (347C>G) da lugar a un cambio de serina por treonina en posición 116. No se conoce con exactitud el mecanismo por el que actúa el polimorfismo, por el que se ha observado un descenso en su actividad catalítica de manera que aumenta los precursores de las purinas (Dervieux et al., 2004). Se ha relacionado con más efectividad de metotrexate en monoterapia de artritis reumatoide así como de mayor toxicidad gastrointestinal del fármaco que inhibe la DHFR y la TYMS, disminuyendo la producción de THF (Weisman et al., 2006). En el presente trabajo se observó que los individuos GG, en el último día de tratamiento, mostraron un incremento mayor de folato intraeritrocitario respecto del nivel basal. En el resto de parámetros no obtuvimos diferencias significativas entre los genotipos. Tampoco hubo diferencias para este genotipo al distribuir a la población por sexos. Estos resultados corroboran los referidos anteriormente en los trabajos de Dervieux y Weisman por los que fue seleccionado este polimorfismo bajo la hipótesis de que acumulan más folato intraeritrocitario los GG porque utilizan menos folato para la síntesis de novo de purinas.

5.3.3.2. ESR1: rs9340799 y rs2234693

Este gen codificante del ESR α presenta múltiples polimorfismos de los que hemos seleccionado dos SNPs intrónicos: el rs9340799 reconocido por la endonucleasa de restricción XbaI que resulta de una sustitución A>G y el rs2234693, reconocido por la enzima PvuII, T>C; ambos en desequilibrio de ligamiento. Se han relacionado con mayor actividad estrogénica debido a una mayor transcripción del gen del ESR1 ya que actúan a nivel unión de los factores de transcripción (Herrington et al., 2002; Schuit et al., 2005). La hipótesis que planteamos en el estudio de este receptor es la relación de la actividad estrogénica con el metabolismo de los folatos. Se ha evidenciado en múltiples trabajos que relacionan los niveles de Hcy con los diferentes niveles de

estrógenos en el ciclo menstrual (Tallova et al., 1999), tras la menopausia (Mijatovic and van der Mooren, 2001) y en transexuales (Giltay et al., 2013). En este mismo sentido, se han publicado trabajos que asocian un aumento de la actividad estrogénica con una disminución de los niveles de receptores de folatos (receptor α) en tejidos específicos provenientes de cánceres mamarios (Kelley et al., 2003; O'Shannessy et al., 2012).

Dada la naturaleza esteroidea del estradiol, su mecanismo de acción se debe a la unión a receptores nucleares y modula de esta manera la expresión génica. Uno de los genes que regula es el de la aromatasa (CYP19). La aromatasa cataliza la conversión de esteroides de 19 carbonos a estrógenos y es esencial para la síntesis de estradiol. A través del ESR1 el estradiol puede modular a su vez la expresión del gen de CYP19 como demostraron Kinoshita y Chen en una línea celular de cáncer de mama (Kinoshita and Chen, 2003).

Estos dos polimorfismos se estudian clásicamente de forma individual y por sus reconocidos haplotipos. En trabajos recientes también se han estudiado en función del número de copias AT relacionadas con menor actividad estrogénica (Schuit et al., 2005).

Sobre el polimorfismo rs9340799 no se observan diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados al comparar los sujetos AA con los que muestran uno o dos alelos variantes (AG-GG) en los diferentes días de tratamiento. Tampoco existe diferencia en este SNP cuando dividimos la población por género. En los sujetos que portan el alelo G apreciamos una tendencia no significativa en todos los días del tratamiento a introducir más folato dentro del hematíe ya que las variaciones porcentuales del folato intraeritrocitario fueron superiores respecto a los que son AA y el incremento sérico fue menor. El alelo G está relacionado con un aumento de la actividad del ESR1 (Herrington et al., 2002; Schuit et al., 2005).

El folato sérico el día 30 en los individuos CC del polimorfismo rs2234693 presentaba un mayor incremento porcentual respecto del nivel basal frente a los CT-

TT. Al dividir la población por sexos, en los hombres no se observaron diferencias entre los genotipos en los 3 parámetros bioquímicos estudiados. En las mujeres, el genotipo CC (homocigoto mutado) es el que muestra mayor incremento porcentual respecto del nivel basal tanto en folato intraeritrocitario como en el sérico el día 30. El genotipo CC está asociado a un incremento de la actividad estrogénica por un aumento de la transcripción del receptor (Herrington et al., 2002; Schuit et al., 2005). Este resultado diferencial entre sexos abunda en la relación estrógenos y folatos propuesta.

En este trabajo se observó que en el haplotipo GC, el día 2 de tratamiento presentaron un incremento significativo de folato intraeritrocitario sobre los haplotipos AT y los AC. Al estudiar los haplotipos por sexo esta significación desapareció en hombres incrementándose en mujeres (las GC presentaron un mayor incremento de folato intraeritrocitario). Como hemos referido en el análisis de los genotipos individuales, los resultados de los haplotipos confirman y superan los niveles de significación de los obtenidos para el genotipo CC.

Las diferencias obtenidas en este trabajo entre sexos se refieren a un aumento del folato intraeritrocitario en las mujeres en el genotipo CC del rs2234693 y en el haplotipo GC en el segundo día de tratamiento. Estos resultados avalan la hipótesis de una relación entre la actividad estrogénica y el flujo de folatos al compartimento intracelular. Este flujo podría estar mediado por una regulación transcripcional de los estrógenos sobre los canales o receptores de folatos (Nilsson et al., 2012) por lo que podríamos concluir que los estrógenos tienen un efecto de regulación positiva en el metabolismo de los folatos. Una mayor actividad estrogénica del receptor en el genotipo CC o en el haplotipo GC sería concordante con que las mujeres acumulen más folato intraeritrocitario .

Dado que el estudio de haplotipos representa un orden de interpretación superior para los estudios de asociación de polimorfismos, decidimos ampliar la valoración de los haplotipos a otra propuesta de distribución haplotípica de los grupos. Basándonos en el trabajo de Schuit y colaboradores (Schuit et al., 2005) que hallaron menor concentración de estradiol en un grupo de mujeres postmenopáusicas asociado

al haplotipo AT, analizamos el efecto que este haplotipo puede tener en el metabolismo de los folatos. Dividimos los sujetos por sexo y en función de la duplicidad o no del haplotipo AT. En mujeres el análisis se realizó de dos maneras: excluyendo el genotipo GGCC como lo propone Schuit o incluyendo el mencionado genotipo. Los resultados obtenidos sin incluir GG/CC fueron: grupo 0 (AG/CT) presentaron una mayor elevación de folato sérico e intraeritrocitario los días 2 y 5 respectivamente respecto del nivel basal que los grupos 1(AA/CT) y 2(AA/TT). Esta misma distribución no la pudimos hacer en el grupo de hombres, ya que la n fue muy reducida.

La distribución de estos haplotipos se fundamenta en los niveles de estradiol asociados a los mismos según Schuit que observa que las mujeres con haplotipo 0 presentan mayores niveles de estradiol. Nuestros resultados respecto al metabolismo de folatos de forma indirecta confirman una relación de la distribución de folatos positiva en suero y eritrocitos que vendría a avalar la hipótesis de asociación de actividad estrogénica con mayor eficiencia en el metabolismo de los folatos. Dado que la distribución de los grupos propuesta por Schuit nos resultaba un tanto sesgada debido a la omisión de los genotipos GG/CC que también se podrían considerar como grupo 0 por la ausencia de AT realizamos el análisis de los grupos incluyéndolos. El análisis realizado produjo la pérdida de significación de la distribución propuesta por Schuit. No tenemos una explicación plausible de tal resultado al igual que el trabajo de Schuit, que tampoco especifica el porqué de la exclusión.

Los mencionados resultados a la espera de ser confirmados en otros estudios, nos parecen una vía interesante para ayudar a dilucidar las diferencias ya asumidas en los niveles de Hcy entre hombres y mujeres, así como su papel en el riesgo cardiovascular diferencial entre sexos. Hasta la fecha no existen resultados que hayan asociado estos polimorfismos con los niveles de Hcy y pool de folatos.

5.3.3.3. MTHFD1 rs2236225 (c.1958G>A)

La MTHFD1 es una enzima trifuncional con actividad 5,10-metilenTHF deshidrogenasa, 5,10-metilenTHF ciclohidrolasa y 10-formilTHF sintetasa. Cataliza las reacciones secuenciales de la interconversión de formas monocarbonadas de folatos. El polimorfismo que hemos escogido para nuestro trabajo se trata de un SNP en el que el cambio de G>A en posición 1958 origina un cambio de aminoácido en la proteína Arg653Gln (Hol et al., 1998). Este polimorfismo se ha asociado a riesgo de DTN en diferentes poblaciones (Jiang et al., 2014) y pérdidas fetales entre otras alteraciones del embarazo (Parle-McDermott et al., 2005). Se sabe poco acerca del fenotipo de esta enzima variante, pero por la naturaleza deletérea de este polimorfismo se ha podido comprobar en ratones sin el dominio sintetasa que no sobreviven al periodo embrionario (MacFarlane et al., 2009). La disminución de la disponibilidad de folatos causada por la MTHFD1 variante para la síntesis de pirimidinas y para la remetilación de Hcy resultaría en una incorporación anómala de dUMP en el DNA así como una metilación anómala del mismo. Ambos efectos son dos factores asociados a DTN (Meng et al., 2015).

A nivel metabólico, hemos encontrado en el grupo de mujeres homocigotas para el alelo mutado un incremento de folato sérico en el quinto día de tratamiento respecto del nivel basal superior a las AG-GG. A la vista de lo publicado hasta ahora justificamos este resultado debido a una disfunción enzimática de la MTHFD1 que utiliza menor cantidad de folato dirigida a la síntesis de pirimidinas ó la remetilación de Hcy a Met.

5.3.3.4. MTHFR

La MTHFR cataliza la reducción irreversible del ácido 5, 10-metilenTHF a 5-metilTHF, en la que participa el NADPH como coenzima dador de electrones (Goyette et al., 1994). El correcto funcionamiento de esta vía exige un aporte suficiente de folatos y vitamina B₁₂ así como una actividad adecuada de la enzima. La MTHFR es clave en el metabolismo de los folatos ya que una actividad reducida de la misma

disminuye la formación de 5-metilTHF y condiciona el funcionamiento del ciclo de los metilos. Hay descritos más de 12 variantes alélicas del gen que codifica esta enzima ("OMIM Entry - * 607093 - 5,10-METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE; MTHFR," n.d.). En nuestro trabajo hemos seleccionado los dos SNPs más relevantes con mayor repercusión en riesgo cardiovascular, cáncer, DTN, aborto, entre otras patologías: rs1801133, 677C>T y rs1801131, 1298 A->C. A continuación discutiremos las diferencias halladas tras el tratamiento en los tres metabolitos estudiados en conjunto.

➤ **rs1801133 (677C>T)**

La sustitución de una citosina por una timina en el nucleótido 677 del gen, que origina un cambio de alanina por valina da lugar a una enzima de menor actividad (Frosst et al., 1995) y se ha asociado a hiperhomocisteinemia.

En este polimorfismo se hallaron diferencias significativas en varones en un menor descenso de la Hcy el día 5, un aumento del fólico sérico del día 30 y una tendencia a disminuir del fólico intra hasta el día 30, todo ello asociado al alelo T en la comparación CT-TT vs CC. En mujeres no sucedió así, no hubo diferencias significativas entre los genotipos. Destacar en el grupo femenino que las CT-TT mantuvieron folato intraeritrocitario con un aumento en porcentaje del nivel basal por encima durante todo el tratamiento y al mes del mismo. Las diferencias halladas al dividir la población por sexos no se aprecian al comparar los genotipos en el grupo.

Estas variaciones en la distribución de folatos puede estar relacionada con la actividad de la MTHFR por una concentración diferencial de especies de folatos que podría influir en su acúmulo o en la poliglutamilación previa a su salida al compartimento extracelular, ya que para un flujo de folatos intra y extra celular los folatos tienen que estar en forma de THF (Varela Moreiras, G y Alonso Aperte, E, 2005). Por otro lado la menor eficiencia en descender la Hcy en varones puede estar relacionada con la menor concentración de folatos intraeritrocitarios mediada por el alelo T. El hecho de que no se dé en mujeres puede que esté relacionado con el efecto

estrogénico sobre el eje de folatos-Hcy que enmascara el papel de estos polimorfismos. Esta posibilidad se apoya en la temprana consecución del plateau de folato sérico en las mujeres en comparación con los hombres que observamos en nuestro estudio.

➤ **rs1801131 (A1298C)**

La sustitución de adenina por citosina la posición 1298 resulta en un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína de glutamina por alanina (posición 429). Este cambio, en el sitio regulador de la enzima, resulta en una MTHFR de menor actividad, más pronunciada en estado homocigoto. Ni el genotipo AC ni el CC se ha relacionado con hiperhomocisteinemia ni con niveles de folato más bajos de una manera aislada como sucede con el polimorfismo C677T. Sin embargo la combinación de ambos estados heterocigóticos para los dos polimorfismos se han asociado a una actividad reducida de la MTHFR, Hcy más elevada y un descenso en los niveles de folato sérico (van der Put et al., 1998).

En nuestra población, en los sujetos heterocigóticos (AC) se observó un incremento significativo del folato intraeritrocitario respecto del nivel basal en el último día de tratamiento respecto a los AA. Al dividir la población por género no se observaron diferencias entre hombres en folato intraeritrocitario pero sí en el porcentaje folato sérico el décimo día de tratamiento respecto del nivel basal, siendo superior en los hombres que no presentaban mutación (AA) de este polimorfismo. En mujeres no hubo ninguna diferencia en el comportamiento de los parámetros estudiados entre genotipos. El estudio individual de este polimorfismo pensamos que no aporta asociaciones contrastables sino se tiene en cuenta su dependencia haplotípica con el otro polimorfismo cercano del mismo gen MTHFR que es el C677T. De hecho, los resultados que se obtienen se pueden correlacionar con la existencia o no del alelo T del C677T que tiene una funcionalidad enzimática disminuida. Los resultados obtenidos en el genotipo AC, consideramos que están condicionados en una población ACCT y ACCC con ausencia obligada del ACTT. Como anteriormente hemos

observado el alelo T del C677T presenta una disminución del folato intraeritrocitario y una tendencia al aumento del sérico.

Los dos SNPs que estudiamos en la MTHFR deben ser evaluados en su conjunto ya que por su proximidad en el gen y como ha sido publicado en diversos trabajos existe un desequilibrio de ligamiento completo o casi completo entre ambos (Ogino and Wilson, 2003). De hecho en nuestra población no encontramos ningún sujeto con un posible haplotipo TC (CT-CC, TT-AC ni TT-CC). Por otro lado, la frecuencia de haplotipos que hayamos en nuestro grupo de estudio se asemeja a lo publicado en el meta-análisis de Ogino y Wilson (Ogino and Wilson, 2003).

Al agrupar los individuos según el número de mutaciones, en hombres sin alelos variantes se observó una mayor velocidad de entrada de folato intraeritrocitario en el día 2, y disminuye progresivamente en los de 1 y 2 mutaciones. Respecto a la evolución del tratamiento ese efecto inicial se vio amortiguado al final del tratamiento no observándose diferencias el día 30. En el sentido contrario sucede con el folato sérico ya que los hombres con 0 mutaciones presentaron menor respuesta al tratamiento en el día 2, frente a los de 1 y 2 mutaciones, quizás debido a que en ese periodo inicial entra más folato al interior del hematíe. Como efecto significativo de estas tendencias se da un aumento significativo de folato sérico el día 30 en sujetos con 2 mutaciones respecto a los de 0 mutaciones.

Las tendencias que observamos en el grupo masculino no existen e incluso parecen estar invertidas en las mujeres. Este efecto puede estar mediado por la conocida influencia del factor estrogénico sobre el metabolismo de los folatos principalmente en mujeres.

Por tanto podemos decir que observamos un dimorfismo sexual en la respuesta al tratamiento con folatos entre hombres y mujeres desde el punto de vista del nº de mutaciones de la MTHFR siendo el hombre más sensible a los cambios.

5.3.3.5. MTRR rs1801394 (c.66A>G)

La 5 Metil tetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa reductasa ó MTR reductasa reduce el cofactor de la metionina sintasa ó MTR (cobalamina II a cobalamina I) para que la MTR sea funcional y pueda llevar a cabo la remetilación de Hcy a Met. La sustitución de Ile por Met en posición 22 en la proteína variante del polimorfismo MTRR A66G interfiere en la unión de la MTRR a la MTR. Se ha visto que requiere hasta cuatro veces más cantidad de MTRR para activar la MTR. (Olteanu et al., 2002). Por tanto una menor actividad en la remetilación de Hcy a Met afecta a la disponibilidad de folatos para la síntesis de purinas y de timidina (menos conversión de 5-metilTHF a THF) y en definitiva para la síntesis de DNA. Este polimorfismo se ha asociado a mayor riesgo de DTN pero su influencia viene determinada también por los niveles de vitamina B₁₂ (Linden et al., 2006).

En nuestro trabajo, los sujetos de genotipo homocigoto salvaje presentaron menor incremento porcentual de folato intraeritrocitario respecto del nivel basal el último día de tratamiento. Este polimorfismo no presenta dimorfismo de género ya que sólo se observa en la población total perdiéndose la significación cuando dividimos la población por sexos, aunque en las mujeres la significación estadística no se alcanzó por muy poco (t=2.45). Nuestros resultados detectan un aumento del folato intraeritrocitario asociado al alelo mutado, este aumento puede relacionarse con un aumento de la concentración de 5-metilTHF, quizás referido a la renombrada trampa de folatos, ya que el paso de Hcy a Met se ve frenado por la disminución de la actividad de la MTR mediada por la MTRR.

5.3.3.6. RFC1 rs1051266 (c.80A>G)

El gen RFC1 codifica el transportador de folato reducido (*reduced folate carrier 1*), también denominado SCL19A1, del inglés *solute carrier family 19 member A1*. Como su propio nombre indica se trata de una proteína soluble transportadora de folato reducido (5-metilTHF) y regula la concentración intracelular de folatos.

El SNP rs1051266, c.80A>G, denominado en algunas publicaciones 80G>A, origina un cambio en la proteína del aminoácido histidina por arginina en posición 27. Su relación con el metabolismo de folatos-Hcy no está clara ni el efecto concreto en la actividad del transportador. Este polimorfismo ha sido estudiado en relación a la concentración de folato sérico, intraeritrocitario y Hcy buscando una posible implicación en la patogénesis de enfermedades asociadas con déficit de folato. Los resultados publicados por diversos autores han sido contradictorios. Por un lado hay diversos autores que no han hallado asociación alguna con la concentración de folato intraeritrocitario (Chango et al., 2000; Veselá et al., 2005), folato plasmático (Chango et al., 2000; Devlin et al., 2006) ni con Hcy (Devlin et al., 2006). Sin embargo otros autores han descrito tendencias no significativas entre el alelo G y una menor concentración de folato intraeritrocitario (Morin et al., 2003; Yates and Lucock, 2005). El mayor estudio llevado a cabo hasta la fecha con más de 10000 participantes (Fredriksen et al., 2007) encontró un descenso de folato sérico en individuos portadores del alelo A pero no documentaron los niveles de folato intraeritrocitario.

En nuestra población los individuos AG y GG mostraron un aumento significativo, respecto al homocigótico silvestre (AA), en el porcentaje de folato intraeritrocitario respecto del nivel basal. Esta diferencia se observó el último día de tratamiento en todo el grupo y al dividir la población por sexos, solo en los hombres. Nuestros resultados no pueden compararse con los trabajos mencionados anteriormente puesto que en ellos no existe un tratamiento con folatos. Lo que postulan, los resultados obtenidos en este trabajo, es un aumento del porcentaje de variación, que podría estar de acuerdo con una menor cantidad no significativa de folato intraeritrocitario basal y no con una aumento del transporte neto de folatos correspondiente al alelo G. Esto estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por Morin y colaboradores y el grupo de Yates y Lucock, aunque como hemos expresado antes son ensayos distintos. Por otro lado no hallamos disminución del folato sérico hallado por Stanisławska-Sachadyn (Stanisławska-Sachadyn et al., 2009) aunque en nuestro caso el folato sérico mostraba unos niveles de saturación que correspondían al “plateau” que produce el tratamiento. Este último grupo en una población de la misma edad puso de manifiesto un dimorfismo sexual en este polimorfismo. Encontraron en

las mujeres AA y AG una mayor concentración de folato intraeritrocitario y así postularon que las mujeres homocigotas para el alelo G podrían tener más riesgo de tener un hijo afecto de DTN y de desarrollar patologías asociadas al déficit de folato como las ECV. Este mismo grupo de autores en un trabajo anterior establecieron una posible implicación hormonal en las diferencias de género halladas en las concentraciones de Hcy (Stanisławska-Sachadyn et al., 2008). La regulación de la expresión del RFC1 no ha sido caracterizada por completo, pero el hecho de que este polimorfismo muestre diferencias en los mismos genotipos en un género sugiere que los estrógenos pudieran afectar la expresión del RFC1. Esta idea se apoya en el hecho de que hay otro transportador celular de folatos que actúa por endocitosis, el Folr1, no estudiado en este trabajo, está regulado por la concentración de folatos extracelular, el incremento de Hcy, la concentración de esteroides como el 17 β estradiol (Rochman et al., 1985; Kelley et al., 2003).

La principal diferencia y dificultad que hemos tenido al buscar una explicación a nuestros resultados comparándonos con otros estudios es que en la bibliografía consultada los genotipos se asocian a concentraciones (y no a variaciones porcentuales), sin tener en cuenta el aporte de folato. Hasta la fecha sólo hemos encontrado una publicación que haya estudiado este polimorfismo tras suplementación con ácido fólico (Cabo et al., 2015). La dosis de folato empleada fue mucho menor (0.8mg/día), con una duración del tratamiento de la mitad del tiempo (14 días), con 2 determinaciones de concentración de folatos y Hcy, basales y tras el tratamiento; en una población de mayor edad que la nuestra (53.5 \pm 7 años).

Por otro lado es interesante el estudio conjunto con otros polimorfismo del eje y concreto con el de MTHFR 677 C>T que el grupo de Cabo y de otros autores han llevado a cabo. En el trabajo de Cabo y colaboradores tras la suplementación con folato hallaron mayor incremento del folato sérico en el grupo AG-CC (RFC1 A80G-MTHFR C677T) que en los GG-CT/TT. En nuestro caso el reducido número de sujetos no nos permitió el análisis conjunto de ambos polimorfismos en la población dividida por sexos. Consideramos nuestros resultados en cuanto la diferente utilización de los hombres portadores del alelo G del RFC1 c. 80 A>G una aportación novedosa respecto

a lo publicado por otros grupos y que el dimorfismo sexual puede ser un enfoque interesante para investigar en el transporte celular de folatos.

5.3.3.7. TCN2776 rs1801198 (c.776G>A)

La transcobalamina 2 es una globulina transportadora de vitamina B₁₂. Se han descrito varios polimorfismos en el gen que codifica esta enzima, nosotros estudiamos dos SNPs (rs9606756 y rs1801198) en los que el alelo mutado origina el cambio de un aminoácido en la secuencia de la proteína (ver tabla 3). El genotipo homocigoto mutado se ha asociado a menor transcripción del gen de la transcobalamina y a cambios conformacionales en la proteína que parecen afectar su afinidad por el receptor del complejo transcobalamina-vitamina B₁₂ en lugar de la B₁₂ (Namour et al., 1998; Namour et al., 2001).

El efecto del rs1801198 en las reacciones en las que está implicada la B₁₂ ha sido contradictorio. En general, los trabajos publicados al respecto coinciden en que las variantes de esta proteína transportadora de cobalamina pueden afectar a la afinidad por el receptor y en consecuencia pueden verse comprometidas las reacciones en las que está implicada la vitamina B₁₂ como cofactor: recuperación de Met por parte de la MTR y en la reacción catalizada por la metil malonil coA mutasa en la oxidación de ácidos grasos. De este modo puede tener lugar un elevación de los sustratos de estas reacciones: Hcy y Metil malonil CoA (MMA). En el caso de la ruta metabólica que nos ocupa y la implicación de este polimorfismo en el metabolismo de los folatos, algunos autores han hallado niveles de Hcy más altos en individuos GG (Castel-Dunwoody et al., 2005; Aléssio et al., 2007) y otros no encontraron asociación alguna (Miller et al., 2002; Afman et al., 2002). Estas diferencias posiblemente puedan ser atribuidas al diseño del estudio, población, edad, etc. En lo que convergen a la hora de asociarlo con la clínica es que dicho cambio se pondría de manifiesto ante un déficit de vitamina B₁₂ (Riedel et al., 2011).

En nuestro caso los sujetos no presentan déficit de vitamina B₁₂ y nuestro hallazgo en los hombres GG con un menor porcentaje de folato sérico al final del tratamiento. Consideramos que al no haber deficiencia de vitamina B₁₂ los resultados de asociación de este polimorfismo resultan poco relevantes.

5.3.3.8. TYMS rs2853542 (C>G, 28bp VNTR 3R)

La TYMS es una proteína clave para la división celular ya que participa en el paso limitante de la síntesis de novo de pirimidinas, esencial para la síntesis de DNA. En concreto cataliza la síntesis de dTMP a partir de dUMP y 5,10-metilenTHF. En la bibliografía hay descritos 3 polimorfismos en las regiones no codificantes (del inglés *untranslated regions*, UTR) que han demostrado alterar la actividad enzimática de la TYMS y la estabilidad del RNAm. Dos de ellos en la región 5'UTR: el rs34743033 que consiste en 2 (2R) o 3 (3R) repeticiones en tándem de un fragmento de 28pb en la zona promotora y el rs2853542, un SNP G>C dentro del genotipo 3R del polimorfismo anterior. El tercero es una delección de 6pb, rs34489327, de la región 3' UTR. (Michael V. Mandola et al., 2003; Mandola et al., 2004). La TYMS utiliza el mismo sustrato que la MTHFR, por lo que se ha postulado que un incremento de la actividad de la TYMS atribuida a estos polimorfismos podría elevar los niveles de Hcy ya que el 5, 10-metilenTHF es dirigido hacia la síntesis de dTMP en vez de a la remetilación de la Hcy a Met, acumulando Hcy en plasma (Trinh et al., 2002; Brown et al., 2004).

La TYMS es una enzima sensible a la concentración de folato intracelular, en un modelo publicado en 2011 obtuvieron que su actividad enzimática se incrementa en situaciones de menor concentración de folato intracelular (Neuhouser et al., 2011).

En nuestro trabajo el alelo variante G del rs2853542 mostró un efecto contrario entre sexos que se diluye al valorar el grupo en su conjunto. Por un lado en los hombres portadores del alelo variante G el porcentaje de folato intraeritrocitario fue significativamente menor que los CC en el último día de tratamiento. Lo contrario

sucedió en mujeres en las que en las CG el folato intraeritrocitario fue significativamente mayor.

En el trabajo de Ho, Massey y King se evalúan los polimorfismos de la TYMS y su efecto en las concentraciones de Hcy, clasifica los individuos en función del genotipo de la TYMS como de baja actividad o alta actividad. Los que portan el G están dentro de los de alta actividad (Ho et al., 2010). Por tanto una enzima que en teoría sería de alta actividad y que haría que la TYMS utilizara más 5,10-metilenTHF en un sexo acumula menos folato intraeritrocitario (hombres) que en el otro. Este efecto es compatible con un dimorfismo de género en la regulación de la actividad de la TYMS hasta ahora no descrita.

5.4. Influencia del tratamiento en los niveles de homocisteína

5.4.1. Población de estudio

El tratamiento con folínico produjo una disminución de la concentración de Hcy plasmática en todos los sujetos tratados, este descenso se observó desde el 2º día de tratamiento y se estabilizó al 10º día. Incluso al mes de haber finalizado, los valores de Hcy se mantuvieron significativamente por debajo del valor basal. Sólo un individuo mostró una concentración Hcy plasmática superior en el día 60.

Es bien conocida esta disminución de Hcy en plasma tras la administración de folatos (Wald et al., 2001; Ashfield-Watt et al., 2002; Rader, 2002; Venn et al., 2003). El descenso de Hcy plasmática en la bibliografía consultada se lleva a cabo a partir del 5º día de tratamiento a dosis semejantes, y no se han hecho determinaciones antes del 5º día (B. J. Venn et al., 2002; Alfthan et al., 2003) a diferencia del nuestro. En un estudio realizado en pacientes sometidos a hemodiálisis, la administración de ácido levofolínico intravenoso, parece ser más eficaz que la de ácido fólico para prevenir la hiperhomocisteinemia (Hauser et al., 2001). Trabajos posteriores no han hallado diferencias significativas en la reducción de Hcy en pacientes de diálisis cuando se compara fólico vs folínico (Armada et al., 2003; Soleimani et al., 2011). En el presente trabajo, la administración de Isovorin® parece disminuir la concentración de Hcy en un

porcentaje mayor (> 40%) si bien estamos ante una población sana en la que el aclaramiento de Hcy no está afectado por la insuficiencia renal.

El ácido folínico (5-formilTHF) ha sido elegido debido a que prácticamente la totalidad de los folatos se encuentran como 5-metilTHF que presentan una biodisponibilidad muy similar al 5-formilTHF. Las diferencias en porcentajes y la velocidad en el descenso de Hcy que distingue este estudio de otros en los que se utilizó el ácido fólico puede ser debido a la mejor biodisponibilidad del 5-formilTHF respecto de otras especies de THF.

La evolución de los niveles de Hcy presentó un plateau hacia el décimo día de tratamiento. Esta estabilidad es coincidente con el plateau observado para el folato sérico. Este plateau se puede reflejar cuantitativamente calculando la ratio fólico sérico/Hcy que proponemos en este trabajo

5.4.2. Influencia del sexo

Las diferencias entre sexos de los niveles de Hcy son conocidas y están ampliamente descritas (Lussier-Cacan et al., 1996; Fukagawa et al., 2000; Jacques et al., 2001; Ganji et al., 2003; Lindeman et al., 2003; Ganji and Kafai, 2006; MacFarlane et al., 2011). A diferencia de otros trabajos hemos realizado determinaciones más tempranas desde el comienzo del tratamiento para detectar la inmediatez del efecto de la administración de folato en los niveles de Hcy. La mayor velocidad de descenso de Hcy sucedió en el segundo día. Sin embargo este hecho podría atribuirse a la administración de 5- formilTHF que rápidamente se convierte en 5-metilTHF a diferencia del ácido fólico (Ghandour et al., 2002).

A diferencia de otros estudios sobre suplementación con ácido folínico (50-80µg) en hombres y mujeres (Winkels et al., 2008) hemos utilizado una dosis alta (5mg) y analizado variaciones, no las concentraciones (Lussier-Cacan et al., 1996). Con estas dosis quisimos alcanzar un efecto de saturación metabólica y los resultados muestran que lo conseguimos, dado que los plateaus de folato sérico y Hcy. Con esta

saturación podemos descartar que el factor dietético tan influyente en las diferencias de género, dejando el estado hormonal y genético como el principal factor que condiciona el funcionamiento del ciclo.

Hallamos una diferencia en la velocidad de asimilación de folatos entre sexos, que nos lleva a relacionar el papel hormonal sobre el metabolismo de los mismos. En niños los niveles de Hcy aumentan con la edad, y las diferencias entre sexos se instauran en la pubertad cuando la producción hormonal es diferente entre sexos (Must et al., 2003). Es conocido que los estrógenos influyen en los niveles de Hcy y que cuando se restauran en la mujer menopaúsica con terapia hormonal sustitutiva los niveles de Hcy descienden (Mijatovic and van der Mooren, 2001). En el propio ciclo menstrual se han hallado diferentes niveles de Hcy entre las fases folicular y luteínica (J. Tallova et al., 1999).

El papel de control de las hormonas sexuales sobre los niveles de Hcy en humanos se ha descrito también en un estudio clínico realizado sobre transexuales a los que se le administraron hormonas durante el proceso de cambio de sexo (Giltay et al., 2003). Estos autores atribuyen el descenso de Hcy en el grupo de transexuales de hombre a mujer en primer lugar a los estrógenos (etinil estradiol), a los cambios en la masa muscular, a la reducción de albúmina y al efecto anabolizante de los andrógenos en la eritropoyesis si bien este último efecto no pudieron corroborarlo ya que no obtuvieron diferencias en el nivel de hemoglobina y el hematocrito.

Con el diseño de nuestro estudio, por la homogeneidad en edad de los participantes y la alta dosis de folato, podemos suponer que el estradiol marca las diferencias entre géneros. Estudios in vitro en tumores han mostrado el efecto de los estrógenos en la expresión de receptores y transportadores de folatos (Kelley et al., 2003; O'Shannessy et al., 2012) lo que sugiere que sería el mecanismo por el que los hombres metabolizan el folato de una manera diferente y las mujeres acumulan más folato y presentan una menor Hcy basal que los hombres.

Otros estudios previos obtuvieron conclusiones similares ya en los 90

(Jacobsen et al., 1994; Lussier-Cacan et al., 1996). Lo que no queda claro es sobre qué parte del sistema actúan las hormonas, sistema enzimático de donantes de metilos, sistema de transporte de folatos o ambos. Con nuestro planteamiento hemos hallado un dimorfismo sexual tanto a nivel bioquímico como genético y proponemos posibles mecanismos candidatos para explicar el mencionado dimorfismo, basándonos sobre todo en la influencia hormonal distintiva sobre regulación de la expresión enzimática y mecanismos de transporte del sistema.

5.4.3. Contribución de los folatos al descenso de Hcy

Nuestros datos muestran una correlación inversa significativa entre la Hcy y folatos sérico e intraeritrocitario, tanto en hombres como en mujeres, con más impacto (r mayor) en el folato intraeritrocitario. Podemos decir por tanto que la mayor contribución al descenso de Hcy fue la llevada a cabo por el folato intraeritrocitario. Nuestros hallazgos experimentales coinciden con el reciente modelo publicado con el que se simula la relación entre los niveles plasmáticos de folato y los metabolitos del ciclo de la Met (Duncan et al., 2012).

Entre los dos folatos, el intraeritrocitario correlaciona mejor con la Hcy lo que concuerda con el hecho de que el folato intraeritrocitario representa mejor que el sérico las reservas intracelulares de folato. Tras la revisión de 14 trabajos en los que estudian el coeficiente de correlación Hcy-folatos, Farrel, Kirsch y Herrmann determinaron que el grado de correlación es similar y que no hay claramente un marcador superior (Farrell et al., 2013)

Dado el comportamiento de los folatos en los distintos compartimentos y la evolución de los niveles de Hcy a lo largo del tratamiento se observa que la evolución de la Hcy y folato sérico presenta mayor paralelismo que la correlación Hcy-folato intraeritrocitario; a pesar de que en el rango de medida la correlación estadística sea algo mayor, como ya hemos expuesto. Este hecho nos podría indicar que la valoración funcional del eje puede estar determinada por folatos séricos y Hcy (Marouf et al., 2007; Cheng et al., 2009), más que lo propuesto por otros autores en los folatos intraeritrocitarios (Chadefaux et al., 1994). Se podría fundamentar desde el punto de

vista funcional otorgándole a la Hcy el papel central o parámetro de referencia de la funcionalidad del sistema. Por tanto, cuando el descenso de Hcy se hace independiente del aporte de folatos se puede decir que el organismo no necesita más folatos. Como el plateau de Hcy coincide con el de folatos séricos se podría proponer que cuando se adquiere una ratio máxima de folato sérico/Hcy el sistema esta funcionalmente saturado.

Los resultados obtenidos establecieron diferencias significativas en la evolución de la concentración de folatos y Hcy en los distintos compartimentos fisiológicos. Estas ratios marcan el equilibrio de flujo entre los folatos en los compartimientos intra y extracelular, en ambos géneros.

La evolución de las ratios folato intraeritrocitario/sérico y folato intraeritrocitario/Hcy y folato sérico/Hcy permiten establecer un índice funcional del eje siendo los tres parámetros son interdependientes.

Entre sexos no hubo diferencias significativas en cuanto a la razón de folatos entre compartimentos. La ratio de folatos tanto sérico como intraeritrocitario y Hcy presentó una evolución fuertemente significativa entre géneros a partir del día 5 hasta el día 30.

El que tiene una correlación visual y de saturación más clara es la relación folato sérico/Hcy. La ratio folato sérico/Hcy presenta un rango de 7.74 -14.22 en hombres y de 14.65 a 19.33 en mujeres entre los días 5 y 30 en los que la ratio es significativamente diferente entre sexos. Si los dinteles son óptimos o no desde el punto de vista fisiológico no lo podemos establecer. Cuando se alcanza ese dintel, desde la perspectiva del funcionamiento del eje, podría ser una medida a tener en cuenta más que los valores estándares que presentan a nivel basal ratios de 1,66 en hombres y 2,46 en mujeres.

Las mujeres muestran una mayor relación de folato sérico e intraeritrocitario/Hcy por lo que tendrían un metabolismo más eficiente que los hombres en el manejo de la misma dosis que se traduce en una Hcy más baja.

En resumen, teniendo en cuenta que la Hcy plasmática es un reflejo del metabolismo del eje folatos-Met intracelular, la marcada diferencia de comportamiento nos da a entender una mayor capacidad de reserva de folato intraeritrocitario en mujeres que se refleja en menor concentración de Hcy plasmática. Corroboramos lo ya publicado al observar una ratio en la mujer favorable desde el punto de vista de la hiperhomocisteinemia.

5.4.4. Influencia de los polimorfismos genéticos en Hcy

5.4.4.1. BMHT rs3733890, c.716G>A

La BHMT se encarga de la conversión de betaína Hcy y de dimetilglicina a Met. En el polimorfismo estudiado, el alelo mutado se ha asociado a DTN, en dietas con bajo consumo de folatos y B6 a mayor riesgo ECV. En modelos animales se ha visto este polimorfismo que aumenta la Hcy hasta 6 veces y por ello este polimorfismo se ha incluido entre los predictores de los niveles de Hcy plasmática normalizada por el folato intraeritrocitario (Clifford et al., 2012)

La regulación de la BHMT ha sido estudiada con resultados contradictorios. El grupo de Ou publicó que la SAM inhibe la acción del enzima (Ou et al., 2007) y sin embargo un estudio anterior había evidenciado lo contrario (Park and Garrow, 1999). Una dieta baja en Met y folatos parecen aumentar la expresión de BHMT (Pajares and Pérez-Sala, 2006), esto último concuerda con los resultados obtenidos ya que una enzima regulada a la baja por un gran aporte de folatos disminuiría su capacidad de evacuar Hcy. En nuestro trabajo, en los hombres AA la Hcy plasmática descendió en mayor medida en el día 5 que en los AG-GG. En el grupo de mujeres ni folato sérico e intraeritrocitario ni Hcy mostraron un comportamiento diferente en los genotipos de la

BHMT estudiados. El hecho de que sólo se observe en varones puede estribar también en que su mayor nivel de Hcy permita que estas variaciones en función de los distintos genotipos sean detectables estadísticamente al disminuir las desviaciones estándar de los valores en poblaciones sin diferenciar por sexos.



6. CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1.- La administración diaria de una dosis media-alta de ácido folínico durante un mes ha puesto de manifiesto un dimorfismo sexual en el metabolismo de los folatos.

a. Las mujeres alcanzan un incremento máximo de folato circulante antes que los hombres y describen un patrón diferente

b. El almacenamiento intraeritrocitario es significativamente superior en mujeres al final del tratamiento

c. Con 5 mg/día de ácido levofolínico, no hemos alcanzado la saturación de folato intraeritrocitario, al final del tratamiento, en ninguno de los sexos.

2.- El folato intraeritrocitario presenta una mayor correlación con el descenso de Hcy que el folato sérico

3.- La ratio folato sérico/ Hcy puede ser considerada como el índice funcional del eje de los folatos-Hcy

4.- Existe un dimorfismo sexual en los polimorfismos estudiados de la BHMT, MTHFR, RFC1 y TYMS, observado en función de la respuesta al tratamiento

5.- En el haplotipo GC, asociado a una mayor actividad estrogénica, de los dos polimorfismos estudiados del ESR1 hemos hallado un incremento de folato intraeritrocitario en las mujeres. Lo cual avala el papel de los estrógenos en el metabolismo de la Hcy.

6.- Otros polimorfismos estudiado de enzimas del eje de los folatos (ATIC, MTHFD1, y MTRR) sin presentar dimorfismo sexual, han mostrado resultados coherentes con su grado de implicación funcional en el metabolismo de los folatos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



7. BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Afman, L.A., Lievers, K.J.A., van der Put, N.M.J., Trijbels, F.J.M., Blom, H.J. **Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects.** *Eur. J. Hum. Genet.* 10, 433–438, 2002.
2. Aida, K., Tawata, M., Negishi, M., Onaya, T. **Mouse glycine N-methyltransferase is sexually dimorphic and regulated by growth hormone.** *Horm. Metab. Res.* 29, 646–649, 1997.
3. Aléssio, A.C.M., Höehr, N.F., Siqueira, L.H., Bydlowski, S.P., Annichino-Bizzacchi, J.M. **Polymorphism C776G in the transcobalamin II gene and homocysteine, folate and vitamin B12 concentrations. Association with MTHFR C677T and A1298C and MTRR A66G polymorphisms in healthy children.** *Thrombosis Research* 119, 571–577, 2007.
4. Alfthan, G., Laurinen, M.S., Valsta, L.M., Pastinen, T., Aro, A. **Folate intake, plasma folate and homocysteine status in a random Finnish population.** *Eur J Clin Nutr* 57, 81–88, 2003.
5. Al-Tahan, J., González-Gross, M., Pietrzik, K. **B-Vitamin status and intake in European adolescents. A review of the literature.** *Nutrición Hospitalaria*, 2006. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309226697003> (acceso el 11/09/2015)
6. Anna Merino. **Manual de Citología de Sangre Periférica.** Grupo Acción Médica. 2005
7. Arabelovic, S., Sam, G., Dallal, G.E., Jacques, P.F., Selhub, J., Rosenberg, I.H., Roubenoff, R.,. **Preliminary evidence shows that folic acid fortification of the food supply is associated with higher methotrexate dosing in patients with rheumatoid arthritis.** *J Am Coll Nutr* 26, 453–455, 2007.
8. Armada, E., Pérez, C., Otero, A., Esteban, J., Camba, M., Gayoso, P., Suárez, D., **Neither folic nor folinic acid normalize homocysteine levels in hemodialysis patients.** *Clin. Nephrol.* 60, 168–175, 2003.
9. Arrobas Velilla, T., Aguilar Doreste J.A., Pocoví Mieras, M., Gómez Gerique, J.A., Castro Castro M.J., Candás Estebáñez B., Romero Román, C., Esteban Salán, J.C., Vella Ramírez J.C., Calmarza Calmarza, P., Rodríguez García, E., Fabiani Romero, F., Puzo Foncillas, J. **Utilidad clínica y recomendaciones para la medición de la concentración de homocisteína como factor de riesgo cardiovascular. Recomendación 2014. SEQC, 2015**
10. Ashfield-Watt, P. a. L., Moat, S.J., Newcombe, R.G., McDowell, I.F.W. **Effect of supplementation with folic-acid on relation between plasma homocysteine, folate, and vitamin B12.** *Lancet* 360, 171–172, 2002
11. Asselt, D.Z. van, Groot, L.C. de, Staveren, W.A. van, Blom, H.J., Wevers, R.A., Biemond, I., Hoefnagels, W.H. **Role of cobalamin intake and atrophic gastritis in**



mild cobalamin deficiency in older Dutch subjects. *Am J Clin Nutr* 68, 328–334, 1998

12. Assmann, G., Cullen, P., Fruchart, J.-C., Greten, H., Naruszewicz, M., Olsson, A., Paoletti, R., Riesen, W., Stoll, M., Tikkanen, M., von Eckardstein, A., *International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease*. **Implications of emerging risk factors for therapeutic intervention.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15, 373–381, 2005.
13. Bailey, L.B. **Folate in Health and Disease**, Second Edition. CRC Press. 2009.
14. Bailey, L.B. **Dietary reference intakes for folate: the debut of dietary folate equivalents.** *Nutr. Rev.* 56, 294–299, 1998.
15. Beard, C.M., Panser, L.A., Katusic, S.K.. **Is excess folic acid supplementation a risk factor for autism?** *Med. Hypotheses* 77, 15–17, 2011.
16. Blakley, R.L. **Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds.** *Eur J Biochem* 168, 251–253, 1987
17. Blanco Vaca, F., Deulofeu, R., Vilaseca, M.A., Chacón, P., Dulín, E.. **Determinación de homocisteína en plasma: metodología, interpretación de resultados y papel en la evaluación del riesgo vascular.** *Quím Clín* 21(4), 243–250, 2002.
18. Blom, H.J., Boers, G.H., van den Elzen, J.P., van Roessel, J.J., Trijbels, J.M., Tangerman, A. **Differences between premenopausal women and young men in the transamination pathway of methionine catabolism, and the protection against vascular disease.** *Eur. J. Clin. Invest.* 18, 633–638, 1988.
19. Boers, G.H., Smals, A.G., Trijbels, F.J., Leermakers, A.I., Kloppenborg, P.W.. **Unique efficiency of methionine metabolism in premenopausal women may protect against vascular disease in the reproductive years.** *J. Clin. Invest.* 72, 1971–1976, 1983.
20. Bos, M.J., Schuit, S.C.E., Koudstaal, P.J., Hofman, A., Uitterlinden, A.G., Breteler, M.M.B. **Variation in the Estrogen Receptor α Gene and Risk of Stroke. The Rotterdam Study.** *Stroke* 39, 1324–1326, 2008.
21. Bostom, A.G., Shemin, D., Lapane, K.L., Nadeau, M.R., Sutherland, P., Chan, J., Rozen, R., Yoburn, D., Jacques, P.F., Selhub, J., Rosenberg, I.H. **Folate status is the major determinant of fasting total plasma homocysteine levels in maintenance dialysis patients.** *Atherosclerosis* 123, 193–202, 1996.
22. Boushey, C.J., Beresford, S.A., Omenn, G.S., Motulsky, A.G. **A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes.** *JAMA* 274, 1049–1057, 1995.
23. Brattström, L.E., Hultberg, B.L., Hardebo, J.E. **Folic acid responsive postmenopausal homocysteinemia.** *Metab. Clin. Exp.* 34, 1073–1077, 1985.

24. Brown, K.S., Kluijtmans, L.A.J., Young, I.S., McNulty, H., Mitchell, L.E., Yarnell, J.W.G., Woodside, J.V., Boreham, C.A., McMaster, D., Murray, L., Strain, J.J., Whitehead, A.S. **The thymidylate synthase tandem repeat polymorphism is not associated with homocysteine concentrations in healthy young subjects.** *Hum Genet* 114, 182–185, 2004.
25. Cabo, R., Hernes, S., Slettan, A., Haugen, M., Ye, S., Blomhoff, R., Mansoor, M.A., **Effect of genetic polymorphisms involved in folate metabolism on the concentration of serum folate and plasma total homocysteine (p-tHcy) in healthy subjects after short-term folic acid supplementation: a randomized, double blind, crossover study.** *Genes Nutr* 10(3), 456, 2015.
26. Carvalho, C.M.B., Pena, S.D.J. **Optimization of a multiplex minisequencing protocol for population studies and medical genetics.** *Genet. Mol. Res.* 4, 115–125, 2005
27. Casazza, K., Page, G.P., Fernandez, J.R. **The association between the rs2234693 and rs9340799 estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk factors for cardiovascular disease: a review.** *Biol Res Nurs* 12, 84–97, 2010.
28. Castel-Dunwoody, K.M. von, Kauwell, G.P., Shelnut, K.P., Vaughn, J.D., Griffin, E.R., Maneval, D.R., Theriaque, D.W., Bailey, L.B. **Transcobalamin 776C→G polymorphism negatively affects vitamin B-12 metabolism.** *Am J Clin Nutr* 81, 1436–1441, 2005.
29. Catherine Desoto, R.T.H. **Synthetic folic acid supplementation during pregnancy may increase the risk of developing autism.** *J Pediatr Biochem* 2(4) 251-261, 2012
30. Chadeaux, B., Cooper, B.A., Gilfix, B.M., Lue-Shing, H., Carson, W., Gavsie, A., Rosenblatt, D.S. **Homocysteine: relationship to serum cobalamin, serum folate, erythrocyte folate, and lobation of neutrophils.** *Clin Invest Med* 17, 540–550, 1994.
31. Chango, A., Emery-Fillon, N., de Courcy, G.P., Lambert, D., Pfister, M., Rosenblatt, D.S., Nicolas, J.-P. **A Polymorphism (80G→A) in the Reduced Folate Carrier Gene and Its Associations with Folate Status and Homocysteinemia.** *Mol Genet Metab.* 70, 310–315, 2000.
32. Cheng, C.-H., Tsai, T.-P., Chen, W.-S., Huang, Y.-C. **Serum folate is a reliable indicator of hyperhomocysteinemia and borderline hyperhomocysteinemia in young adults.** *Nutr Res* 29, 743–749, 2009.
33. Chen, I.W., Silberstein, E.B., Maxon, H.R., Volle, C.P., Sohnlein, B.H. **Semiautomated system for simultaneous assays of serum vitamin B12 and folic acid in serum evaluated.** *Clin Chem* 28, 2161–2165, 1982.

34. Chew, T.W., Jiang, X., Yan, J., Wang, W., Lusa, A.L., Carrier, B.J., West, A.A., Malysheva, O.V., Brenna, J.T., Gregory, J.F., Caudill, M.A. **Folate intake, MTHFR genotype, and sex modulate choline metabolism in mice.** *J Nutr* 141, 1475–1481, 2011.
35. Choi, J.-H., Yates, Z., Veysey, M., Heo, Y.-R., Lucock, M. **Contemporary issues surrounding folic Acid fortification initiatives.** *Prev Nutr Food Sci* 19, 247–260. 2014.
36. Clifford, A.J., Chen, K., McWade, L., Rincon, G., Kim, S.-H., Holstege, D.M., Owens, J.E., Liu, B., Müller, H.-G., Medrano, J.F., Fadel, J.G., Moshfegh, A.J., Baer, D.J., Novotny, J.A. **Gender and Single Nucleotide Polymorphisms in MTHFR, BHMT, SPTLC1, CRBP2, CETP, and SCARB1 Are Significant Predictors of Plasma Homocysteine Normalized by RBC Folate in Healthy Adults.** *J Nutr* 142, 1764–1771, 2012.
37. Cole, B.F., Baron, J.A., Sandler, R.S., Haile, R.W., Ahnen, D.J., Bresalier, R.S., McKeown-Eyssen, G., Summers, R.W., Rothstein, R.I., Burke, C.A., Snover, D.C., Church, T.R., Allen, J.I., Robertson, D.J., Beck, G.J., Bond, J.H., Byers, T., Mandel, J.S., Mott, L.A., Pearson, L.H., Barry, E.L., Rees, J.R., Marcon, N., Saibil, F., Ueland, P.M., Greenberg, E.R., Polyp Prevention Study Group. **Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial.** *JAMA* 297, 2351–2359, 2007.
38. Córdoba Porras, A, Blanco Vaca, F, González Sastre, F. **Bases moleculares de hiperhomocisteinemia.** *Quím Clín* 5–18, 1998.
39. Córdoba-Porras, A., Sánchez-Quesada, J.L., González-Sastre, F., Ordóñez-Llanos, J., Blanco-Vaca, F. **Susceptibility of plasma low- and high-density lipoproteins to oxidation in patients with severe hyperhomocysteinemia.** *J Mol Med.* 74, 771–776, 1996.
40. Couce ML, Balcells S, Dalmau J, Grinberg D, Rodés M, Vilaseca MA. **Homocistinuria. Protocolos de diagnóstico y tratamiento de los errores congénitos del metabolismo.** Enar SA ,Madrid, 2007.
41. Czeizel, A.E., Métneki, J., Dudás, I. **Higher rate of multiple births after periconceptional vitamin supplementation.** *N Engl J Med* 330, 1687–1688, 1994.
42. de Lau, L.M.L., Refsum, H., Smith, A.D., Johnston, C., Breteler, M.M.B. **Plasma folate concentration and cognitive performance: Rotterdam Scan Study.** *Am J Clin Nutr* 86, 728–734, 2007.
43. de Meer, K., Smulders, Y.M., Dainty, J.R., Smith, D.E.C., Kok, R.M., Stehouwer, C.D.A., Finglas, P.M., Jakobs, C. **[6S]5-methyltetrahydrofolate or folic acid**

supplementation and absorption and initial elimination of folate in young and middle-aged adults. *Eur J Clin Nutr* 59, 1409–1416, 2005.

44. Deroo, B.J., Korach, K.S. **Estrogen receptors and human disease.** *J Clin Invest* 116, 561–570, 2006.
45. Derouiche, F., Bôle-Feysot, C., Naïmi, D., Coëffier, M. **Hyperhomocysteinemia-induced oxidative stress differentially alters proteasome composition and activities in heart and aorta.** *Biochem Biophys Res Commun* 452, 740–745, 2014.
46. Dervieux, T., Furst, D., Lein, D.O., Capps, R., Smith, K., Walsh, M., Kremer, J. **Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis.** *Arthritis & Rheumatism* 50, 2766–2774, 2004.
47. Devlin, A.M., Clarke, R., Birks, J., Evans, J.G., Halsted, C.H. **Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population.** *Am J Clin Nutr* 83, 708–713, 2006.
48. Duffy, M.E., Hoey, L., Hughes, C.F., Strain, J.J., Rankin, A., Souverein, O.W., Dullemeijer, C., Collings, R., Hooper, L., McNulty, H. **Biomarker responses to folic acid intervention in healthy adults: a meta-analysis of randomized controlled trials.** *Am J Clin Nutr* 99, 96–106, 2014.
49. Duncan, T.M., Reed, M.C., Nijhout, H.F. **The relationship between intracellular and plasma levels of folate and metabolites in the methionine cycle: A model.** *Mol Nutr Food Res*, 57(4):628-36, 2013
50. Ebbing, M., Bønaa, K.H., Nygård, O., Arnesen, E., Ueland, P.M., Nordrehaug, J.E., Rasmussen, K., Njølstad, I., Refsum, H., Nilsen, D.W., Tverdal, A., Meyer, K., Vollset, S.E. **Cancer incidence and mortality after treatment with folic acid and vitamin B12.** *JAMA* 302, 2119–2126, 2009.
51. Ericson, A., Källén, B., Aberg, A. **Use of multivitamins and folic acid in early pregnancy and multiple births in Sweden.** *Twin Res* 4, 63–66, 2001.
52. Farrell, C.-J.L., Kirsch, S.H., Herrmann, M. **Red cell or serum folate: what to do in clinical practice?** *Clin Chem Lab Med* 51, 555–569, 2013.
53. Fenton, A, Rosenberg, L, Scriver, C, Beaudet, A, Swly, W, Valle, D **Inherited disorders of cobalamin transport and metabolism, in: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.** *McGraw-Hill Inc*, New York, NY, pp. 3129–3149., 1995.

54. Figtree, G.A., Noonan, J.E., Bhindi, R., Collins, P. **Estrogen receptor polymorphisms: significance to human physiology, disease and therapy.** *Recent Pat DNA Gene Seq* 3, 164–171, 2009.
55. Fox, C.S., Yang, Q., Cupples, L.A., Guo, C.-Y., Atwood, L.D., Murabito, J.M., Levy, D., Mendelsohn, M.E., Housman, D.E., Shearman, A.M. **Sex-Specific Association between Estrogen Receptor- α Gene Variation and Measures of Adiposity: The Framingham Heart Study.** *JCEM* 90, 6257–6262, 2005.
56. Fredriksen, Å., Meyer, K., Ueland, P.M., Vollset, S.E., Grotmol, T., Schneede, J. **Large-scale population-based metabolic phenotyping of thirteen genetic polymorphisms related to one-carbon metabolism.** *Hum Mutat* 28, 856–865, 2007.
57. Friso, S., Lamon-Fava, S., Jang, H., Schaefer, E.J., Corrocher, R., Choi, S.-W. **Oestrogen replacement therapy reduces total plasma homocysteine and enhances genomic DNA methylation in postmenopausal women.** *Br J Nutr* 97, 617–621, 2007.
58. Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C.A., Matthews, R.G., Boers, G.J.H., den Heijer, M., Kluijtmans, L.A.J., van den Heuvel, L.P., Rozen, R. **A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.** *Nat Genet* 10, 111–113, 1995.
59. Fukagawa, N.K., Martin, J.M., Wurthmann, A., Prue, A.H., Ebenstein, D., O'Rourke, B. **Sex-related differences in methionine metabolism and plasma homocysteine concentrations.** *Am J Clin Nutr* 72, 22–29, 2000.
60. Gallagher, C.J., Langefeld, C.D., Gordon, C.J., Campbell, J.K., Mychalecky, J.C., Bryer-Ash, M., Rich, S.S., Bowden, D.W., Sale, M.M. **Association of the Estrogen Receptor- α Gene With the Metabolic Syndrome and Its Component Traits in African-American Families The Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study.** *Diabetes* 56, 2135–2141, 2007.
61. Ganji, V., Kafai, M.R., 2009. **Demographic, lifestyle, and health characteristics and serum B vitamin status are determinants of plasma total homocysteine concentration in the post-folic acid fortification period, 1999-2004.** *J Nutr* 139, 345–352.
62. Ganji, V., Kafai, M.R. **Population reference values for plasma total homocysteine concentrations in US adults after the fortification of cereals with folic acid.** *Am J Clin Nutr* 84, 989–994, 2006
63. Ganji, V., Kafai, M.R., Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Demographic, health, lifestyle, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994.** *Am J Clin Nutr* 77, 826–833, 2003.

64. Garrow, T.A. **Purification, kinetic properties, and cDNA cloning of mammalian betaine-homocysteine methyltransferase.** *J Biol Chem* 271, 22831–22838 , 1996.
65. Gartler, S.M., Hornung, S.K., Motulsky, A.G. **Effect of chronologic age on induction of cystathionine synthase, uroporphyrinogen I synthase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in lymphocytes.** *PNAS* 78, 1916–1919, 1981.
66. Gaustadnes, M., Wilcken, B., Oliveriusova, J., McGill, J., Fletcher, J., Kraus, J.P., Wilcken, D.E. **The molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in Australian patients: genotype-phenotype correlations and response to treatment.** *Hum Mutat* 20, 117–126. , 2002.
67. Ghandour, H., Bagley, P.J., Shemin, D., Hsu, N., Jacques, P.F., Dworkin, L., Bostom, A.G., Selhub, J. **Distribution of plasma folate forms in hemodialysis patients receiving high daily doses of L-folinic or folic acid.** *Kidney Int* 62, 2246–2249, 2002.
68. Gibson, R.S.. **Principles of Nutritional Assessment.** Oxford University Press. , 2005
69. Giltay, E.J., Hoogeveen, E.K., Elbers, J.M.H., Gooren, L.J.G., Asscheman, H., Stehouwer, C.D. **Effects of Sex Steroids on Plasma Total Homocysteine Levels: A Study in Transsexual Males and Females.** *J Clin Endocrinol Metab.* 83(2):550-3, 1998
70. Giltay, E.J., Verhoef, P., Gooren, L.J.G., Geleijnse, J.M., Schouten, E.G., Stehouwer, C.D.A. **Oral and transdermal estrogens both lower plasma total homocysteine in male-to-female transsexuals.** *Atherosclerosis* 168, 139–146, 2003.
71. Giovannucci, E., Rimm, E.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C. **Alcohol, low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men.** *J Natl Cancer Inst.* 87, 265–273, 1995.
72. Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Fuchs, C., Rosner, B.A., Speizer, F.E., Willett, W.C. **Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study.** *An. Intern Med* 129, 517–524, 1998.
73. González-Gross, M., Sola, R., Castillo, M.J. **Folato: una vitamina en constante evolución.** *Med Clin (Barc)* 119, 627–635, 2002.
74. Goyette, P., Sumner, J.S., Milos, R., Duncan, A.M., Rosenblatt, D.S., Matthews, R.G., Rozen, R. **Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification.** *Nat Genet* 7, 551, 1994.



75. Haggarty, P., McCallum, H., McBain, H., Andrews, K., Duthie, S., McNeill, G., Templeton, A., Haites, N., Campbell, D., Bhattacharya, S. **Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilisation: prospective cohort study.** *Lancet* 367, 1513–1519, 2006.
76. Hao, L., Yang, Q.-H., Li, Z., Bailey, L.B., Zhu, J.-H., Hu, D.J., Zhang, B.-L., Erickson, J.D., Zhang, L., Gindler, J., Li, S., Berry, R.J. **Folate status and homocysteine response to folic acid doses and withdrawal among young Chinese women in a large-scale randomized double-blind trial.** *Am J Clin Nutr* 88, 448–457, 2008.
77. Hauser, A.-C., Hagen, W., Rehak, P.H., Buchmayer, H., Födinger, M., Papagiannopoulos, M., Bieglmayer, C., Aspner, R., Köller, E., Ignatescu, M., Hörl, W.H., Sunder-Plassmann, G. **Efficacy of folinic versus folic acid for the correction of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients.** *Am J Kidney Dis* 37, 758–765, 2001.
78. Herrington, D.M. **Role of estrogen receptor-alpha in pharmacogenetics of estrogen action.** *Curr Opin Lipidol* 14, 145–150, 2003.
79. Herrington, D.M., Howard, T.D., Brosnihan, K.B., McDonnell, D.P., Li, X., Hawkins, G.A., Reboussin, D.M., Xu, J., Zheng, S.L., Meyers, D.A., Bleecker, E.R. **Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein.** *Circulation* 105, 1879–1882, 2002.
80. Hesecker, H., Schmitt, G. **Effect of long-term supplementation of folate on folate status in plasma and erythrocytes.** *J Nutr Sci Vitaminol* 33, 163–168, 1987.
81. Hibbard, B.M. **The role of folic acid in pregnancy; with particular reference to anaemia, abortion and abortion.** *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 71, 529–542, 1964.
82. Hogeveen, M., den Heijer, M., Schonbeck, Y., Ijland, M., van Oppenraaij, D., Gunnewiek, J.K., Blom, H.J. **The effect of folinic acid supplementation on homocysteine concentrations in newborns.** *Eur J Clin Nutr* 64, 1266–1271, 2010.
83. Hol, F.A., van der Put, N.M., Geurds, M.P., Heil, S.G., Trijbels, F.J., Hamel, B.C., Mariman, E.C., Blom, H.J. **Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects.** *Clin Genet* 53, 119–125, 1998.
84. Ho, V., Massey, T.E., King, W.D. **Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on total plasma homocysteine concentrations.** *Mol Genet. Metab.* 101, 18–24, 2010.
85. Iniesta, R., Guinó, E., Moreno, V. **Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos.** *Gaceta Sanitaria* 19, 333–341, 2005.

86. Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline. **Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline**, *The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health*. National Academies Press (US), Washington (DC), 1998.
87. Jacobsen, D.W., Gatautis, V.J., Green, R., Robinson, K., Savon, S.R., Secic, M., Ji, J., Otto, J.M., Taylor, L.M. **Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects**. *Clin Chem* 40, 873–881, 1994.
88. Jacques, P.F., Bostom, A.G., Wilson, P.W., Rich, S., Rosenberg, I.H., Selhub, J. **Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort**. *Am J Clin Nutr* 73, 613–621, 2001.
89. Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., Rogers, G., Selhub, J., Bowman, B.A., Gunter, E.W., Wright, J.D., Johnson, C.L. **Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey**. *Am J Clin Nutr* 69, 482–489, 1999.
90. James, S.J., Melnyk, S., Jernigan, S., Pavliv, O., Trusty, T., Lehman, S., Seidel, L., Gaylor, D.W., Cleves, M.A. **A functional polymorphism in the reduced folate carrier gene and DNA hypomethylation in mothers of children with autism**. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B, 1209–1220, 2010.
91. Jiang, J., Zhang, Y., Wei, L., Sun, Z., Liu, Z. **Association between MTHFD1 G1958A Polymorphism and Neural Tube Defects Susceptibility: A Meta-Analysis**. *PLoS ONE* 9, e101169, 2014.
92. Junaid, M.A., Kuizon, S., Cardona, J., Azher, T., Murakami, N., Pullarkat, R.K., Brown, W.T. **Folic acid supplementation dysregulates gene expression in lymphoblastoid cells—implications in nutrition**. *Biochem Biophys Res Commun* 412, 688–692, 2011.
93. Kalmbach, R.D., Choumenkovitch, S.F., Troen, A.P., Jacques, P.F., D’Agostino, R., Selhub, J. **A 19-Base Pair Deletion Polymorphism in Dihydrofolate Reductase Is Associated with Increased Unmetabolized Folic Acid in Plasma and Decreased Red Blood Cell Folate**. *J Nutr* 138, 2323–2327, 2008.
94. Kang, S.S., Wong, P.W., Zhou, J.M., Cook, H.Y. **Total homocyst(e)ine in plasma and amniotic fluid of pregnant women**. *Metab Clin Exp* 35, 889–891, 1986.
95. Kawakami, K., Omura, K., Kanehira, E., Watanabe, Y. **Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein**



expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res.* 19, 3249–3252, 1999.

96. Kawakami, K., Salonga, D., Park, J.M., Danenberg, K.D., Uetake, H., Brabender, J., Omura, K., Watanabe, G., Danenberg, P.V. **Different Lengths of a Polymorphic Repeat Sequence in the Thymidylate Synthase Gene Affect Translational Efficiency but Not Its Gene Expression.** *Clin Cancer Res* 7, 4096–4101. , 2001.
97. Kelley, K.M.M., Rowan, B.G., Ratnam, M. **Modulation of the Folate Receptor α Gene by the Estrogen Receptor Mechanism and Implications in Tumor Targeting.** *Cancer Res* 63, 2820–2828, 2003.
98. Kelly, G.S., 1998. **Folates: supplemental forms and therapeutic applications.** *Altern Med Rev* 3, 208–220.
99. Kim, J., Park, M.H., Kim, E., Han, C., Jo, S.A., Jo, I. **Plasma homocysteine is associated with the risk of mild cognitive impairment in an elderly Korean population.** *J Nutr* 137, 2093–2097, 2007.
100. Kinoshita, Y., Chen, S. **Induction of aromatase (CYP19) expression in breast cancer cells through a nongenomic action of estrogen receptor alpha.** *Cancer Res.* 63, 3546–3555, 2003.
101. Klebe, S., Golmard, J.-L., Nalls, M.A., Saad, M., Singleton, A.B., Bras, J.M., Hardy, J., Simon-Sanchez, J., Heutink, P., Kuhlensäumer, G., Charfi, R., Klein, C., Hagenah, J., Gasser, T., Wurster, I., Lesage, S., Lorenz, D., Deuschl, G., Durif, F., Pollak, P., Damier, P., Tison, F., Durr, A., Amouyel, P., Lambert, J.-C., Tzourio, C., Maubaret, C., Charbonnier-Beaupel, F., Tahiri, K., Vidailhet, M., Martinez, M., Brice, A., Corvol, J.-C., French Parkinson's Disease Genetics Study Group, International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC). **The Val158Met COMT polymorphism is a modifier of the age at onset in Parkinson's disease with a sexual dimorphism.** *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 84, 666–673, 2013.
102. Klerk, M., Verhoef, P., Clarke, R., Blom, H.J., Kok, F.J., Schouten, E.G., MTHFR Studies Collaboration Group. **MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis.** *JAMA* 288, 2023–2031, 2002.
103. Kluijtmans, L.A., Boers, G.H., Kraus, J.P., van den Heuvel, L.P., Cruysberg, J.R., Trijbels, F.J., Blom, H.J. **The molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in Dutch patients with homocystinuria: effect of CBS genotype on biochemical and clinical phenotype and on response to treatment.** *Am J Hum Genet.* 65, 59–67, 1999.
104. Kluijtmans, L.A.J., Young, I.S., Boreham, C.A., Murray, L., McMaster, D., McNulty, H., Strain, J.J., McPartlin, J., Scott, J.M., Whitehead, A.S.. **Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults.** *Blood* 101, 2483–2488, 2003

105. Koch, W., Hoppmann, P., Pfeufer, A., Mueller, J.C., Schömig, A., Kastrati, A., **No Replication of Association Between Estrogen Receptor α Gene Polymorphisms and Susceptibility to Myocardial Infarction in a Large Sample of Patients of European Descent.** *Circulation* 112, 2138–2142, 2005.
106. Krawinkel, M.B., Strohm, D., Weissenborn, A., Watzl, B., Eichholzer, M., Bärlocher, K., Elmadfa, I., Leschik-Bonnet, E., Hesecker, H. **Revised D-A-CH intake recommendations for folate: how much is needed?** *Eur J Clin Nutr* 68, 719–723, 2014.
107. Krishnamurthy, K.B. **Managing epilepsy during pregnancy: assessing risk and optimizing care.** *Curr Treat Options Neurol* 14, 348–355, 2012.
108. Kruger, W.D., Wang, L., Jhee, K.H., Singh, R.H., Elsas, L.J. **Cystathionine beta-synthase deficiency in Georgia (USA): correlation of clinical and biochemical phenotype with genotype.** *Hum Mutat* 22, 434–441, 2003.
109. Lachman, H.M., Papolos, D.F., Saito, T., Yu, Y.M., Szumlanski, C.L., Weinshilboum, R.M. **Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders.** *Pharmacogenetics* 6, 243–250, 1996.
110. Lamers, Y., Prinz-Langenohl, R., Brämswig, S., Pietrzik, K. **Red blood cell folate concentrations increase more after supplementation with [6S]-5-methyltetrahydrofolate than with folic acid in women of childbearing age.** *Am J Clin Nutr* 84, 156–161, 2006.
111. Larsson, S.C., Giovannucci, E., Wolk, A. **Folate and risk of breast cancer: a meta-analysis.** *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 64–76, 2007.
112. Laurence, K.M., James, N., Miller, M.H., Tennant, G.B., Campbell, H. **Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects.** *Br Med J (Clin Res Ed)* 282, 1509–1511, 1981.
113. Lewis, S.J., Harbord, R.M., Harris, R., Smith, G.D. **Meta-analyses of observational and genetic association studies of folate intakes or levels and breast cancer risk.** *J Natl Cancer Inst* 98, 1607–1622, 2006.
114. Li, F., Feng, Q., Lee, C., Wang, S., Pelleymounter, L.L., Moon, I., Eckloff, B.W., Wieben, E.D., Schaid, D.J., Yee, V., Weinshilboum, R.M. **Human Betaine-Homocysteine Methyltransferase (BHMT) and BHMT2: Common Gene Sequence Variation and Functional Characterization.** *Mol Genet Metab* 94, 326–335, 2008.

115. Lindeman, R.D., Romero, L.J., Yau, C.L., Koehler, K.M., Baumgartner, R.N., Garry, P.J. **Serum homocysteine concentrations and their relation to serum folate and vitamin B12 concentrations and coronary artery disease prevalence in an urban, bi-ethnic community.** *Ethn Dis* 13, 178–185, 2003.
116. Linden, I.J.M. van der, Heijer, M. den, Afman, L.A., Gellekink, H., Vermeulen, S.H.H.M., Kluijtmans, L.A.J., Blom, H.J. **The methionine synthase reductase 66A>G polymorphism is a maternal risk factor for spina bifida.** *J Mol Med* 84, 1047–1054, 2006.
117. Logan, R.F.A., Grainge, M.J., Shepherd, V.C., Armitage, N.C., Muir, K.R., ukCAP Trial Group. **Aspirin and folic acid for the prevention of recurrent colorectal adenomas.** *Gastroenterology* 134, 29–38, 2008.
118. Lucock, M.D., Daskalakis, I., Schorah, C.J., Levene, M.I., Hartley, R. **Analysis and biochemistry of blood folate.** *Biochem Mol Med.* 58, 93–112, 1996.
119. Lundsgaard, A.-M., Kiens, B. **Gender Differences in Skeletal Muscle Substrate Metabolism – Molecular Mechanisms and Insulin Sensitivity.** *Front Endocrinol (Lausanne)* 13;5:195. 2014.
120. Lussier-Cacan, S., Xhignesse, M., Piolot, A., Selhub, J., Davignon, J., Genest, J. **Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits.** *Am J Clin Nutr* 64, 587–593, 1996.
121. MacFarlane, A.J., Greene-Finestone, L.S., Shi, Y. **Vitamin B-12 and homocysteine status in a folate-replete population: results from the Canadian Health Measures Survey.** *Am J Clin Nutr* 94, 1079–1087, 2011.
122. MacFarlane, A.J., Perry, C.A., Girnary, H.H., Gao, D., Allen, R.H., Stabler, S.P., Shane, B., Stover, P.J. **MTHFD1 is an essential gene in mice and alters biomarkers of impaired one-carbon metabolism.** *J Biol Chem* 284, 1533–1539, 2009.
123. Maclean, K.N., Gaustadnes, M., Oliveriusová, J., Janosík, M., Kraus, E., Kozich, V., Kery, V., Skovby, F., Rüdiger, N., Ingerslev, J., Stabler, S.P., Allen, R.H., Kraus, J.P. **High homocysteine and thrombosis without connective tissue disorders are associated with a novel class of cystathionine beta-synthase (CBS) mutations.** *Hum Muta.* 19, 641–655, 2002.
124. Mandola, M.V., Stoehlmacher, J., Muller-Weeks, S., Cesarone, G., Yu, M.C., Lenz, H.-J., Ladner, R.D. **A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity.** *Cancer Research* 63, 2898–2904, 2003.

125. Mandola, M.V., Stoeblmacher, J., Zhang, W., Groshen, S., Yu, M.C., Iqbal, S., Lenz, H.-J., Ladner, R.D. **A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels.** *Pharmacogenetics* 14, 319–327, 2004.
126. Mansoor, M.A., Svardal, A.M., Schneede, J., Ueland, P.M. **Dynamic relation between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and other thiol components in plasma during methionine loading in healthy men.** *Clin. Chem.* 38, 1316–1321, 1992.
127. Marouf, R., Mojiminiyi, O., Qurtom, M., Abdella, N., Al Wazzan, H., Al Humood, S., Al Mazeedy, M. **Plasma homocysteine and hematological factors in patients with venous thromboembolic diseases in Kuwait.** *Acta Haematol.* 117, 98–105, 2007.
128. Martinez, G., Shaw, E.M., Carrillo, M., Zanuy, S. **A protein salting-out method applied in genomic DNA isolation from fish whole blood.** *Biotechniques* 24, 238 – 239, 1998.
129. McCully, K.S. **Chemical Pathology of Homocysteine. IV. Excitotoxicity, Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction, and Inflammation.** *Ann Clin Lab Sci* 39, 219–232, 2009.
130. McCully, K.S. **Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention.** *Am. J. Clin. Nutr.* 86, 1563S–8S, 2007.
131. McGuire, B.W., Sia, L.L., Leese, P.T., Gutierrez, M.L., Stokstad, E.L. **Pharmacokinetics of leucovorin calcium after intravenous, intramuscular, and oral administration.** *Clin Pharm* 7, 52–58, 1988.
132. Meng, J., Han, L., Zhuang, B. **Association between MTHFD1 polymorphisms and neural tube defect susceptibility.** *J Neurol Sci.* 348, 188–194, 2015.
133. Mijatovic, V., van der Mooren, M.J. **Homocysteine in postmenopausal women and the importance of hormone replacement therapy.** *Clin. Chem. Lab. Med.* 39, 764–767, 2001.
134. Miller, J.W., Ramos, M.I., Garrod, M.G., Flynn, M.A., Green, R. **Transcobalamin II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults.** *Blood* 100, 718–720, 2002.
135. Moran, A., Jacobs, D.R., Steinberger, J., Steffen, L.M., Pankow, J.S., Hong, C.-P., Sinaiko, A.R. **Changes in insulin resistance and cardiovascular risk during adolescence: establishment of differential risk in males and females.** *Circulation* 117, 2361–2368, 2008.

136. Morin, I., Devlin, A.M., Leclerc, D., Sabbaghian, N., Halsted, C.H., Finnell, R., Rozen, R. **Evaluation of genetic variants in the reduced folate carrier and in glutamate carboxypeptidase II for spina bifida risk.** *Mol Genet Metab* 79, 197–200, 2003.
137. Morris, M.S., Jacques, P.F., Selhub, J., Rosenberg, I.H. **Total homocysteine and estrogen status indicators in the Third National Health and Nutrition Examination Survey.** *Am. J. Epidemiol.* 152, 140–148, 2000.
138. Muñoz-Moran, E., Dieguez-Lucena, J.L., Fernandez-Arcas, N., Peran-Mesa, S., Reyes-Engel, A. **Genetic selection and folate intake during pregnancy.** *Lancet* 352, 1120–1121, 1998.
139. Must, A., Jacques, P.F., Rogers, G., Rosenberg, I.H., Selhub, J. **Serum Total Homocysteine Concentrations in Children and Adolescents: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III).** *J. Nutr.* 133, 2643–2649, 2003.
140. NACB LMPG Committee Members, Myers, G.L., Christenson, R.H.M., Cushman, M., Ballantyne, C.M., Cooper, G.R., Pfeiffer, C.M., Grundy, S.M., Labarthe, D.R., Levy, D., Rifai, N., Wilson, P.W.F. **National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice guidelines: emerging biomarkers for primary prevention of cardiovascular disease.** *Clin. Chem.* 55, 378–384, 2009.
141. Namour, F., Guy, M., Aimone-Gastin, I., De Nonancourt, M., Mrabet, N., Guéant, J.-L. **Isoelectrofocusing phenotype and relative concentration of transcobalamin II isoproteins related to the codon 259 Arg/Pro polymorphism.** *Biochem Biophys Res Commun* 251, 769–774, 1998.
142. Namour, F., Olivier, J.-L., Abdelmouttaleb, I., Adjalla, C., Debard, R., Salvat, C., Guéant, J.-L. **Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: Relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood.** *Blood* 97, 1092–1098, 2001.
143. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) **Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report.** *Circulation* 106, 3143–3421, 2002.
144. Nazer H, J., Aguila R, A., Cifuentes O, L. **The frequency of twin pregnancies increased in a Chilean hospital associated with periconceptional flour folic acid supplementation.** *Rev Med Chil* 134, 48–52, 2006.

145. Nelen, W.L., Bulten, J., Steegers, E.A., Blom, H.J., Hanselaar, A.G., Eskes, T.K. **Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss.** *Hum. Reprod.* 15, 954–960, 2000.
146. Nelen, W.L., Steegers, E.A., Eskes, T.K., Blom, H.J. **Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss.** *Lancet* 350, 861, 1997.
147. Neuhouwer, M.L., Nijhout, H.F., Gregory, J.F., Reed, M.C., James, S.J., Liu, A., Shane, B., Ulrich, C.M. **Mathematical modeling predicts the effect of folate deficiency and excess on cancer related biomarkers.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20, 1912–1917, 2011.
148. Nilsson, T.K., Laanpere, M., Altmäe, S., Serra-Majem, L., Salumets, A., 2012. **A folate receptor alpha double-mutated haplotype 1816delC–1841A is distributed throughout Eurasia and associated with lower erythrocyte folate levels.** *Mol Biol Rep* 39, 4471–4478.
149. Norlund, L., Grubb, A., Fex, G., Leksell, H., Nilsson, J.E., Schenck, H., Hultberg, B. **The increase of plasma homocysteine concentrations with age is partly due to the deterioration of renal function as determined by plasma cystatin C.** *Clin. Chem. Lab. Med.* 36, 175–178, 1998.
150. Obeid, R., Holzgreve, W., Pietrzik, K. **Is 5-methyltetrahydrofolate an alternative to folic acid for the prevention of neural tube defects?** *J Perinat Med* 41, 469–483, 2013.
151. Obwegeser, R., Hohlagschwandtner, M., Sinzinger, H. **Homocysteine, a pathophysiological cornerstone in obstetrical and gynaecological disorders?** *Hum. Reprod. Update* 5, 64–72, 1999.
152. Oginio, S., Wilson, R.B. **Genotype and haplotype distributions of MTHFR 677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis.** *J Hum Genet* 48, 1–7, 2003.
153. Olivar Roldán, J., Fernández Martínez, A., Díaz Guardiola, P., Martínez Sancho, E., Díaz Gómez, J., Gómez Candela, C. **Clinical management of homocystinuria: case report and review of the literature.** *Nutrición Hospitalaria* 27, 2133–2138, 2012.
154. 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* 41, 13378–13385, 2002.
155. OMIM Entry - * 607093 - 5,10-METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE; MTHFR <http://omim.org/entry/607093> (acceso el 17/09/2015).

156. O'Shannessy, D., Somers, E., Maltzman, J., Smale, R., Fu, Y.-S. **Folate receptor alpha (FRA) expression in breast cancer: identification of a new molecular subtype and association with triple negative disease.** *SpringerPlus* 1, 22, 2012.
157. Ou, X., Yang, H., Ramani, K., Ara, A.I., Chen, H., Mato, J.M., Lu, S.C. **Inhibition of human betaine-homocysteine methyltransferase expression by S-adenosylmethionine and methylthioadenosine.** *Biochem J* 401, 87–96, 2007.
158. Pajares, M.A., Pérez-Sala, D. **Betaine homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism?** *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2792–2803, 2006.
159. Park, E.I., Garrow, T.A. **Interaction between Dietary Methionine and Methyl Donor Intake on Rat Liver Betaine-homocysteine Methyltransferase Gene Expression and Organization of the Human Gene.** *J. Biol. Chem.* 274, 7816–7824, 1999.
160. Parle-McDermott, A., Pangilinan, F., Mills, J.L., Signore, C.C., Molloy, A.M., Cotter, A., Conley, M., Cox, C., Kirke, P.N., Scott, J.M., Brody, L.C. **A polymorphism in the MTHFD1 gene increases a mother's risk of having an unexplained second trimester pregnancy loss.** *Mol. Hum. Reprod.* 11, 477–480, 2005.
161. Perk, J., De Backer, G., Gohlke, H., Graham, I., Reiner, Z., Verschuren, W.M.M., Albus, C., Benlian, P., Boysen, G., Cifkova, R., Deaton, C., Ebrahim, S., Fisher, M., Germano, G., Hobbs, R., Hoes, A., Karadeniz, S., Mezzani, A., Prescott, E., Ryden, L., Scherer, M., Syväne, M., Op Reimer, W.J.M.S., Vrints, C., Wood, D., Zamorano, J.L., Zannad, F., European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). **European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012) : the fifth joint task force of the European society of cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice.** *Int J Behav Med* 19, 403–488, 2012.
162. Polotsky, H.N., Polotsky, A.J. **Metabolic implications of menopause.** *Semin. Reprod. Med.* 28, 426–434, 2010.
163. Preston, F.E., Rosendaal, F.R., Walker, I.D., Briët, E., Berntorp, E., Conard, J., Fontcuberta, J., Makris, M., Mariani, G., Noteboom, W., Pabinger, I., Legnani, C., Scharrer, I., Schulman, S., van der Meer, F.J. **Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia.** *Lancet* 348, 913–916, 1996.
164. MRC Vitamin Study Research Group **Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study.** *Lancet* 338, 131–137, 1991.
165. Quere, I., Bellet, H., Hoffet, M., Janbon, C., Mares, P., Gris, J.C., 1998. A woman with five consecutive fetal deaths: case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinemia prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. *Fertil. Steril.* 69, 152–154.



- 166.Rader, J.I. **Folic acid fortification, folate status and plasma homocysteine.** *J. Nutr.* 132, 2466S–2470S, 2002.
- 167.Ray, J.G., Vermeulen, M.J., Boss, S.C., Cole, D.E.C. **Increased red cell folate concentrations in women of reproductive age after Canadian folic acid food fortification.** *Epidemiology* 13, 238–240, 2002.
- 168.Reay, J.L., Smith, M.A., Riby, L.M. **B Vitamins and Cognitive Performance in Older Adults: Review.** *ISRN Nutr*, 2013.
- 169.Refsum, H., Smith, A.D., Ueland, P.M., Nexø, E., Clarke, R., McPartlin, J., Johnston, C., Engbaek, F., Schneede, J., McPartlin, C., Scott, J.M. **Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion.** *Clin. Chem.* 50, 3–32, 2004.
- 170.Reyes-Engel, A., Muñoz, E., Gaitan, M.J., Fabre, E., Gallo, M., Dieguez, J.L., Ruiz, M., Morell, M. **Implications on human fertility of the 677C→T and 1298A→C polymorphisms of the MTHFR gene: consequences of a possible genetic selection.** *Mol. Hum. Reprod.* 8, 952–957, 2002.
- 171.Reynolds, E. **Vitamin B12, folic acid, and the nervous system.** *Lancet Neurol* 5, 949–960, 2006.
- 172.Riedel, B.M., Molloy, A.M., Meyer, K., Fredriksen, Å., Ulvik, A., Schneede, J., Nexø, E., Hoff, G., Ueland, P.M. **Transcobalamin Polymorphism 67A->G, but Not 776C->G, Affects Serum Holotranscobalamin in a Cohort of Healthy Middle-Aged Men and Women.** *J. Nutr.* 141, 1784–1790, 2011.
- 173.Rochman, H., Selhub, J., Karrison, T. **Folate binding protein and the estrogen receptor in breast cancer.** *Cancer Detect. Prev.* 8, 71–75, 1985.
- 174.Rogers, E.J. **Has enhanced folate status during pregnancy altered natural selection and possibly Autism prevalence? A closer look at a possible link.** *Med. Hypotheses* 71, 406–410, 2008.
- 175.Rosenblatt, D. **Inherited disorders of folate transport and metabolism, in: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.** *McGraw-Hill Inc.*, New York, NY, pp. 3111–3128, 1995.
- 176.Samaniego Vaesken, M.L., Alonso-Aperte, E., Varela-Moreiras, G. **Alimentos fortificados con ácido fólico comercializados en España: tipo de productos, cantidad de ácido fólico que proporcionan y población a la que van dirigidos.** *Nutrición Hospitalaria* 24, 459–466, 2009.
- 177.Schmidt, R.J., Tancredi, D.J., Ozonoff, S., Hansen, R.L., Hartiala, J., Allayee, H., Schmidt, L.C., Tassone, F., Hertz-Picciotto, I. **Maternal periconceptional folic acid**

intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the CHARGE (CHILDhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. *Am. J. Clin. Nutr.* 96, 80–89, 2012.

178. Schuit, S.C.E., Jong, F.H. de, Stolk, L., Koek, W.N.H., Meurs, J.B.J. van, Schoofs, M.W.C.J., Zillikens, M.C., Hofman, A., Leeuwen, J.P.T.M. van, Pols, H.A.P., Uitterlinden, A.G. **Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with estradiol levels in postmenopausal women.** *Eur J Endocrinol* 153, 327–334, 2005.
179. Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN) **Dietary reference values (DRVs) for food energy and nutrients for the UK: panel on DRVs of the Committee on Medical Aspects of Food Policy (COMA) Report on Health and Social Subjects**, 1991.
180. Scott, J.M., Weir, D.G. **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* 2, 337–340, 1981.
181. Sebastio, G., Sperandio, M.P., Panico, M., de Franchis, R., Kraus, J.P., Andria, G. **The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations.** *Am. J. Hum. Genet.* 56, 1324–1333, 1995.
182. Selhub, J., Jacques, P.F., Bostom, A.G., Wilson, P.W., Rosenberg, I.H. **Relationship between plasma homocysteine and vitamin status in the Framingham study population. Impact of folic acid fortification.** *Public Health Rev* 28, 117–14, 2000.
183. Selhub, J., Jacques, P.F., Wilson, P.W., Rush, D., Rosenberg, I.H. **Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population.** *JAMA* 270, 2693–2698, 1993.
184. Selhub, J., Morris, M.S., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H. **Folate–vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency.** *Am J Clin Nutr* 89, 702S–706S, 2009.
185. Seshadri, N., Robinson, K. **Homocysteine, B vitamins, and coronary artery disease.** *Med. Clin. North Am.* 84, 215–237, 2000.
186. Shenkin A, Baines M, Fell GS, Lyon TD **Vitamins and trace elements: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.** *St Louis: Elsevier Saunders*, p. 1075, 2006.
187. Shih, V.E., Fringer, J.M., Mandell, R., Kraus, J.P., Berry, G.T., Heidenreich, R.A., Korson, M.S., Levy, H.L., Ramesh, V. **A missense mutation (I278T) in the cystathionine beta-synthase gene prevalent in pyridoxine-responsive**

homocystinuria and associated with mild clinical phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 34–39, 1995.

188. Shrubsole, M.J., Wagner, C., Zhu, X., Hou, L., Loukachevitch, L.V., Ness, R.M., Zheng, W. **Associations between S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and colorectal adenoma risk are modified by sex.** *Am J Cancer Res* 5, 458–465, 2014.
189. Signore, C., Mills, J.L., Cox, C., Trumble, A.C. **Effects of folic acid fortification on twin gestation rates.** *Obstet Gynecol* 105, 757–762, 2005.
190. Smithells, R.W., Nevin, N.C., Seller, M.J., Sheppard, S., Harris, R., Read, A.P., Fielding, D.W., Walker, S., Schorah, C.J., Wild, J. **Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences.** *Lancet* 1, 1027–1031, 1983.
191. Smithells, R.W., Sheppard, S., Schorah, C.J., Seller, M.J., Nevin, N.C., Harris, R., Read, A.P., Fielding, D.W. **Possible prevention of neural-tube defects by periconceptual vitamin supplementation.** *Lancet* 1, 339–340, 1980.
192. Smolders, R.G.V., de Meer, K., Kenemans, P., Jakobs, C., Kulik, W., van der Mooren, M.J. **Oral estradiol decreases plasma homocysteine, vitamin B6, and albumin in postmenopausal women but does not change the whole-body homocysteine remethylation and transmethylation flux.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 2218–2224, 2005.
193. Smulders, Y.M., Smith, D.E.C., Kok, R.M., Teerlink, T., Gellekink, H., Vaes, W.H.J., Stehouwer, C.D.A., Jakobs, C. **Red blood cell folate vitamers distribution in healthy subjects is determined by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and by the total folate status.** *J. Nutr. Biochem.* 18, 693–699, 2007.
194. Soleimani, A., Usefzadeh, M., Mianehsaz, E., Foroozanfard, F., Nikoueinejad, H., Moraveji, S.A., Nasiri, O., Rajali, M. **Comparison of oral folic acid and folinic acid on blood homocysteine level of patients on hemodialysis.** *Iran J Kidney Dis* 5, 45–49, 2011.
195. Stanisławska-Sachadyn, A., Mitchell, L.E., Woodside, J.V., Buckley, P.T., Kealey, C., Young, I.S., Scott, J.M., Murray, L., Boreham, C.A., McNulty, H., Strain, J.J., Whitehead, A.S. **The Reduced Folate Carrier (SLC19A1) c.80G>A Polymorphism is Associated with Red Cell Folate Concentrations Among Women.** *Ann Hum Genet.* 73, 484–491, 2009.
196. Stanisławska-Sachadyn, A., Woodside, J.V., Brown, K.S., Young, I.S., Murray, L., McNulty, H., Strain, J.J., Boreham, C.A., Scott, J.M., Whitehead, A.S., Mitchell, L.E. **Evidence for sex differences in the determinants of homocysteine concentrations.** *Mol. Genet. Metab.* 93, 355–362, 2008.

197. Steegers-Theunissen, R.P., Boers, G.H., Blom, H.J., Trijbels, F.J., Eskes, T.K. **Hyperhomocysteinaemia and recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae.** *Lancet* 339, 1122–1123, 1992.
198. Stirrat, G.M. **Recurrent miscarriage.** *Lancet* 336, 673–675. , 1990.
199. Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L. **Bioquímica**, 5ª ed. *Reverte.* , 2003.
200. Sundermann, E.E., Maki, P.M., Bishop, J.R. **A Review of Estrogen Receptor α Gene (ESR1) Polymorphisms, Mood, and Cognition.** *Menopause* 17, 874–886, 2010.
201. Surén, P., Roth, C., Bresnahan, M., Haugen, M., Hornig, M., Hirtz, D., Lie, K.K., Lipkin, W.I., Magnus, P., Reichborn-Kjennerud, T., Schjølberg, S., Davey Smith, G., Øyen, A.-S., Susser, E., Stoltenberg, C. **Association between maternal use of folic acid supplements and risk of autism spectrum disorders in children.** *JAMA* 309, 570–577, 2013.
202. Tallova, J., Tomandl, J., Bicikova, M., Hill, M. **Changes of plasma total homocysteine levels during the menstrual cycle.** *Eur. J. Clin. Invest.* 29, 1041–1044, 1999.
203. Tapia, Ó.C. **Bioquímica de los procesos metabólicos.** *Reverte*, 2004.
204. Trinh, B.N., Ong, C.-N., Coetzee, G.A., Yu, M.C., Laird, P.W. **Thymidylate synthase: A novel genetic determinant of plasma homocysteine and folate levels.** *Hum Genet* 111, 299–302, 2002.
205. Ueland, P.M. **Homocysteine species as components of plasma redox thiol status.** *Clin. Chem.* 41, 340–342, 1995.
206. van der Put, N.M., Gabreëls, F., Stevens, E.M., Smeitink, J.A., Trijbels, F.J., Eskes, T.K., van den Heuvel, L.P., Blom, H.J. **A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?** *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1044–1051, 1998.
207. Van Der Put, N.M.J., Van Der Molen, E.F., Kluijtmans, L.A.J., Heil, S.G., Trijbels, J.M.F., Eskes, T.K.A.B., Van Oppenraaij-Emmerzaal, D., Banerjee, R., Blom, H.J. **Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: Relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease.** *QJM* 90, 511–517, 1997.
208. Varela Moreiras, G, Alonso Aperte, E. **Folatos. Vitaminas Hidrosolubles.** *Comité de publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y patología Molecular*, Barcelona, 2005.

209. Venn, B.J., Green, T.J., Moser, R., Mann, J.I. **Comparison of the effect of low-dose supplementation with l-5-methyltetrahydrofolate or folic acid on plasma homocysteine: a randomized placebo-controlled study.** *Am J Clin Nutr* 77, 658–662, 2003.
210. Venn, B.J., Mann, J.I., Williams, S.M., Riddell, L.J., Chisholm, A., Harper, M.J., Aitken, W., Rossaak, J.I. **Assessment of three levels of folic acid on serum folate and plasma homocysteine: a randomised placebo-controlled double-blind dietary intervention trial.** *Eur J Clin Nutr* 56, 748–754, 2002.
211. Verma, D., Chakraborti, B., Karmakar, A., Bandyopadhyay, T., Singh, A.S., Sinha, S., Chatterjee, A., Ghosh, S., Mohanakumar, K.P., Mukhopadhyay, K., Rajamma, U. **Sexual dimorphic effect in the genetic association of monoamine oxidase A (MAOA) markers with autism spectrum disorder.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 50, 11–20, 2014.
212. Veselá, K., Pavlíková, M., Janosíková, B., Andel, M., Zvárová, J., Hyánek, J., Kozich, V. **Genetic determinants of folate status in Central Bohemia.** *Physiol Res* 54, 295–303, 2005.
213. Vitvitsky, V., Prudova, A., Stabler, S., Dayal, S., Lentz, S.R., Banerjee, R. **Testosterone regulation of renal cystathionine β -synthase: implications for sex-dependent differences in plasma homocysteine levels.** *Am J Physiol Renal Physiol*. 293, F594–F600, 2007.
214. Vollset, S.E., Refsum, H., Irgens, L.M., Emblem, B.M., Tverdal, A., Gjessing, H.K., Mosen, A.L., Ueland, P.M. **Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study.** *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 962–968, 2000.
215. Vychytil, A., Födinger, M., Wölfl, G., Enzenberger, B., Auinger, M., Prischl, F., Buxbaum, M., Wiesholzer, M., Mannhalter, C., Hörl, W.H., Sunder-Plassmann, G. **Major determinants of hyperhomocysteinemia in peritoneal dialysis patients.** *Kidney Int.* 53, 1775–1782, 1998.
216. Wald, D.S., Bishop, L., Wald, N.J., Law, M., Hennessy, E., Weir, D., McPartlin, J., Scott, J. **Randomized trial of folic acid supplementation and serum homocysteine levels.** *Arch. Intern. Med.* 161, 695–700, 2001.
217. Wang, L., Lu, J., An, J., Shi, Q., Spitz, M.R., Wei, Q. **Polymorphisms of cytosolic serine hydroxymethyltransferase and risk of lung cancer: a case-control analysis.** *Lung Cancer* 57, 143–151, 2007.
218. Weisman, M.H., Furst, D.E., Park, G.S., Kremer, J.M., Smith, K.M., Wallace, D.J., Caldwell, J.R., Dervieux, T. **Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis.** *Arthritis & Rheumatism* 54, 607–612, 2006.

219. Welch, G.N., Loscalzo, J. **Homocysteine and atherothrombosis.** *N. Engl. J. Med.* 338, 1042–1050, 1998.
220. WHO, World Heart Federation, World Stroke Organization. **Global atlas on cardiovascular disease prevention and control,** 2011. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/ (acceso el 16/08/2015).
221. World Health Organization. **Guideline: Optimal Serum and Red Blood Cell Folate Concentrations in Women of Reproductive Age for Prevention of Neural Tube Defects,** WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee., Geneva. 2015
222. Wierzbicki, A.S. **Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence.** *Diab Vasc Dis Res* 4, 143–150, 2007.
223. Winkels, R.M., Brouwer, I.A., Verhoef, P., Oort, F.V.A. van, Durga, J., Katan, M.B. **Gender and Body Size Affect the Response of Erythrocyte Folate to Folic Acid Treatment.** *J. Nutr.* 138, 1456–1461, 2008.
224. Wolking, S., Schaeffeler, E., Lerche, H., Schwab, M., Nies, A.T. **Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature.** *Clin Pharmacokinet* 54, 709–735, 2015.
225. World Medical Association **Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects.** *J Int Bioethique* 15, 124–129, 2004.
226. Wouters, M.G., Boers, G.H., Blom, H.J., Trijbels, F.J., Thomas, C.M., Borm, G.F., Steegers-Theunissen, R.P., Eskes, T.K. **Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss.** *Fertil. Steril.* 60, 820–825, 1993.
227. Wu, A., Chanarin, I., Slavin, G., Levi, A.J. **Folate deficiency in the alcoholic--its relationship to clinical and haematological abnormalities, liver disease and folate stores.** *Br. J. Haematol.* 29, 469–478. , 1975.
228. Yajnik, C.S., Deshpande, S.S., Jackson, A.A., Refsum, H., Rao, S., Fisher, D.J., Bhat, D.S., Naik, S.S., Coyaji, K.J., Joglekar, C.V., Joshi, N., Lubree, H.G., Deshpande, V.U., Rege, S.S., Fall, C.H.D. **Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study.** *Diabetologia* 51, 29–38, 2008.
229. Yates, Z., Lucock, M. **G80A reduced folate carrier SNP modulates cellular uptake of folate and affords protection against thrombosis via a non homocysteine related mechanism.** *Life Sciences* 77, 2735–2742, 2005.

230. Yetley, E.A., Pfeiffer, C.M., Phinney, K.W., Fazili, Z., Lacher, D.A., Bailey, R.L., Blackmore, S., Bock, J.L., Brody, L.C., Carmel, R., Curtin, L.R., Durazo-Arvizu, R.A., Eckfeldt, J.H., Green, R., Gregory, J.F., Hoofnagle, A.N., Jacobsen, D.W., Jacques, P.F., Molloy, A.M., Massaro, J., Mills, J.L., Nexo, E., Rader, J.I., Selhub, J., Sempos, C., Shane, B., Stabler, S., Stover, P., Tamura, T., Tedstone, A., Thorpe, S.J., Coates, P.M., Johnson, C.L., Picciano, M.F. **Biomarkers of folate status in NHANES: a roundtable summary.** *Am J Clin Nutr* 94, 303S–312S, 2011.
231. Zhang, S.M., Cook, N.R., Albert, C.M., Gaziano, J.M., Buring, J.E., Manson, J.E. **Effect of combined folic acid, vitamin B6, and vitamin B12 on cancer risk in women: a randomized trial.** *JAMA* 300, 2012–2021, 2008-
232. Zhao, R., Min, S.H., Qiu, A., Sakaris, A., Goldberg, G.L., Sandoval, C., Malatack, J.J., Rosenblatt, D.S., Goldman, I.D. **The spectrum of mutations in the PCFT gene, coding for an intestinal folate transporter, that are the basis for hereditary folate malabsorption.** *Blood* 110, 1147–1152, 2007.