

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

**AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE
FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ
GENERAL, DURANT L'EMBARÀS I EFECTE SOBRE
LA SUBFERTILITAT EN DONES**

TESI DOCTORAL

dirigida per la Dra. Michelle Murphy

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Reus
2009**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Departament de Ciències Mèdiques
Bàsiques
C/ Sant Llorenç, 21
43203 Reus
Tel. 977 759305
Fax. 977 759322

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

CERTIFICO:

Que el present treball, titulat "Autoanticossos contra receptors de folat i estat en folats a la població general, durant l'embaràs i efecte sobre la subfertilitat en dones", que presenta la Maria Isabel Berrocal Zaragoza per l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques d'aquesta universitat i que aconsegueix els requeriments per poder optar a aquest títol.

Reus, 19 de febrer de 2009

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES
Maria Isabel Berrocal Zaragoza
ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

A la meua família

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

AGRAÏMENTS

El meu sincer agraïment a la **Dra. Michelle Murphy**, eix principal i responsable de la meva incursió en el fascinant món dels folats. És per mi un referent important i constant d'incassable dinamisme en el món de la recerca, estimuladora dels que l'envolten del coneixement del metabolisme de la homocisteïna i els folats, i a qui agraïxco tot el suport i confiança que ha dipositat en mi.

Al **Dr. Joan Fernández Ballart**, responsable de la Unitat de Medicina Preventiva i Salut Pública de la Universitat Rovira i Virgili, pel seu recolzament i ajuda incondicional. Per la seva aportació dels coneixements en el camp de l'estadística i la medicina, imprescindibles per poder portar a terme els nostres propòsits inicials. Per la seva confiança en aquesta tesi i permetre'm l'estada a SUNY.

I am grateful to **Dr. Edward V Quadros** and **Mr. Jeffrey M Sequeira** for agreeing to participate in this project and to support this project. I thank them for introducing me to this innovative and fascinating area of folate research during my stay in their laboratory in State University of New York-Downstate Medical Center de Brooklyn, Nova York.

Agrair als **Drs. Pere Cavallé-Busquets** i **Ramon Miralles** i, a tot el personal sanitari dels **Serveis d'Obstetria i Ginecologia dels Hospitals Universitaris Sant Joan de Reus i Joan XXIII de Tarragona** per la seva inestimable ajuda en el reclutament de participants a l'estudi NUTCIR. A tots els que van participar en el treball de camp de l'estudi poblacional i del PreC. A la **Dr. Elisabet Vilella** i a tots els membres del **Biobanc IISPV (UNE-EN-ISO:9001-2000)**, per facilitar la meva tasca en el processament de mostres biològiques i l'aprenentatge rigorós en la recollida, processament i emmagatzematge de mostres biològiques en el treball de camp, punt inicial clau imprescindible per poder desenvolupar investigacions amb la rigurositat científica necessària. De la mateixa manera, al personal tècnic del **Laboratori Central**

del **Hospital Universitari Sant Joan de Reus**, per la seva participació en extraccions sanguínies, i processament de mostres.

Agrair a la **Universitat Rovira i Virgili** per la beca predoctoral de la que he gaudit i m'ha permès desenvolupar aquesta tesi.

Al **Dr. John Scott** i **Dra. Anne Molloy** de Trinity College per les determinacions microbiològiques de folats i cobalamina.

Molt especialment a tots els **participants voluntaris**, perquè són un model a seguir per les futures generacions, per la seva aportació en l'avenç en la prevenció de la salut pública.

A la **Fundació Caixa Sabadell**, pel seu recolzament econòmic, a través del qual ha estat possible la meva estada a SUNY.

A **SEIBE**, per la seva col·laboració en l'estudi de treball de camp de l'estudi NUTCIR en què he estat implicada durant tots aquests anys.

A **Carl Wagner**, autor de la fotografia que il·lustra aquesta tesi i que ha cedit per aquesta finalitat.

A la **Dra. M^a Eulàlia Subirà de Galdàcano** de la Unitat d'Antropologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, qui em va introduir en el món de la investigació i que em va donar la primera empenta necessària.

Agrair la càlida acollida del **Shao-Chiang Lai** i de la **Yasumi Nakayama**, a SUNY. No vull oblidar a totes les meves companyes, pels bons i inoblidables moments passats que són els que perduren en el temps. A la **Dra. Marta Ferrer** i a la **Dra. Nancy Babio** per haver compartit els millors MOMENTS que recordarem SEMPRE. A les meves dues companyes d'equip NUTCIR i futures **Dres. Judith Salat** i **Sílvia Fernández**, amb les que he après que amb colors la feina passa molt millor.

En l'aspecte més personal, agrair a la **Susana**, al **Jose**, a la **Raquel**, al **David** i al **Marcelo**, referents d'amistat necessaris en moments baixos. Al **Dani** per la seva inestimable ajuda en la impressió d'aquesta tesi.

Finalment, a la meva família, en especial als meus **Pares** pel seu recolzament incondicional en els meus somnis i objectius. I a la meva germana **Judit** i al **César**.

I a tots aquells que indirectament m'han aportat confiança i fortalesa per creure que es poden aconseguir els somnis i allò de "qui la segueix l'aconsegueix" és realment veritat.

*Donde termina la apatía de la ignorancia, comienza la
responsabilidad del conocimiento*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

RESUM

Els autoanticossos contra els receptors de folat (RF) capaços de bloquejar la unió del folat al lloc específic del RF, i d'impedir el transport de folat a la cèl·lula per aquesta via, van ser descrits al 2004. La presència d'aquests s'ha associat amb embaràs afectat per defectes del tub neural i, amb un risc 2.8 vegades superior de patir avortament espontani entre les dones portadores d'autoanticossos respecte les no portadores. La seva presència en nens ha estat associada amb síndromes del desenvolupament neuronal d'aparició precoç caracteritzats pel dèficit en folats al líquid cerebroespinal.

La via més important de transport dels folats a la cèl·lula és el sistema de portador de folat reduït. Aquest sistema té una funció principal d'homeostasi de folat a la cèl·lula. No obstant, la via de transport que té un major protagonisme entre els teixits amb elevats requeriments en folats és el RF. Aquesta via de transport és especialment important durant la neurogènesi i l'embriogènesi.

Es desconeix la causa de la producció d'aquests autoanticossos. S'han proposat tres possibles mecanismes: 1) epítops de RF generats per lesió/proteolisi de teixits reproductius que junt amb components genètics podrien desencadenar la seva generació; 2) la generació de l'homocisteïna tiolactona (HTL) en situacions de homocisteïna plasmàtica total en dejú (tHcy) elevada podria estimular la N-homocisteïnilització dels residus de lisina del RF, provocant la producció d'autoanticossos contra el mateix receptor; 3) la ingesta de la llet bovina (font de RF amb més del 90% d'homologia amb el RF humà) en situacions de barrera gastrointestinal compromesa i/o errors en la inducció de la tolerància, podria desencadenar la generació d'aquests autoanticossos.

Les mesures preventives per compensar una dieta deficient en folats i les seves implicacions per la salut pública estan establertes. No obstant, no s'ha estudiat si el bloqueig del transport d'aquesta vitamina pel RF, perjudica l'estat en folats en portadors d'autoanticossos ni la prevalença de portadors a la població.

Un dels objectius d'aquesta tesi ha estat determinar la presència d'autoanticossos contra RF a través de la tècnica del *blocking* en grups de la població fins ara no estudiats [població general adulta entre 18-75 anys, a la preconcepció en dones planificant un embaràs, durant l'embaràs (a les 8-12, 15, 24-27, 34 setmanes de gestació), al treball de part i al cordó]. S'ha investigat: l'associació entre la presència d'autoanticossos contra RF i l'estat en folats a la població general, la influència del consum habitual de llet sobre la presència d'autoanticossos contra RF, el risc de subfertilitat entre les dones portadores d'autoanticossos respecte les no portadores, la relació de la presència d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs amb l'estat en folats durant l'embaràs i al cordó, l'associació de la presència d'aquests autoanticossos al cordó amb l'estat en folats al cordó i la influència de la presència d'autoanticossos contra RF sobre el pes al néixer.

La prevalença d'individus portadors d'autoanticossos, en una mostra representativa d'una població mediterrània espanyola adulta no exposada a fortificació obligatòria ni suplementació amb àcid fòlic és del 7.2%. Tant homes com dones adults poden ser portadors d'aquests autoanticossos. La presència d'autoanticossos contra RF amb una titulació mitjana de 0.3 pmol RF blocat/mL en aquesta població, no afecta l'estat en folats ni tHcy. Els resultats obtinguts no recolzen la hipòtesi de la implicació de la HTL en la producció d'autoanticossos contra RF. No obstant, es demostra que els consumidors de llet al quintil més alt (307-1247 g/dia) tenen un risc 2.4 superior de ser portadors d'autoanticossos comparat amb la resta de consumidors. *[Berrocal-Zaragoza et al. J Nutr 2009].*

Les dones portadores d'autoanticossos contra RF a la preconcepció tenen 12 vegades major risc de patir subfertilitat respecte les no portadores *[Berrocal-Zaragoza et al. Fertil Steril 2008]*. Entre les participants que van patir un avortament espontani, no es van detectar autoanticossos contra RF en cap de les seves mostres sanguínies recollides de forma prospectiva.

La presència d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs és d'un 6.3% i al cordó d'un 7.5%. El folat plasmàtic entre el grup de portadores d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs és significativament més elevat respecte el grup de no portadores. Els patrons de fluctuacions del folat plasmàtic, de la cobalamina plasmàtica i de la tHcy són similars en les portadores i no portadores d'autoanticossos al llarg de l'embaràs. No obstant, ser portadora s'associa a un increment de 12.3 nmol/L de folat plasmàtic del cordó respecte a ser no portadora. El fet de que l'estat en folats de la mare i del cordó no es vegi perjudicat per la presència d'autoanticossos contra RF, podria ser degut a l'existència d'algun mecanisme d'adaptació que compensi el bloqueig del transport de folats per autoanticossos a través del RF durant l'embaràs. La presència d'autoanticossos contra RF al cordó, no s'ha associat amb un dèficit en la concentració de folat plasmàtic en aquest. La presència d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs o al cordó, no s'ha associat amb el naixement de nadons amb creixement intra-uterí retardat (pes al néixer per sota del P₁₀ segons la seva edat gestacional i sexe). No obstant, les dones portadores d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs tenen 4.6 vegades més risc de tenir un nadó amb un pes al néixer per sota del P₂₅ respecte a les no portadores. Tot i que un pes per sota del P₂₅ no és clínicament diagnosticat com a patològic, podria indicar el no assoliment de la potència òptima de creixement del fetus que correspondria per la seva constitució genètica.

La presència de titulacions baixes d'autoanticossos contra receptors de folat, no perjudica l'estat en folats a la població ni durant l'embaràs. Aquest fet podria ser degut a un bloqueig parcial del transport de folats o bé a la compensació d'aquest per la via del portador de folat reduït o per altres vies de transport. Es requereixen futures investigacions estudiant individus amb titulacions elevades d'autoanticossos per tal de determinar l'efecte sobre l'estat en folats.

ÍNDEX DE CONTINGUTS

	<i>Pàgina</i>
<i>RESUM</i>	11
<i>ÍNDEX DE CONTINGUTS</i>	13
<i>ÍNDEX DE TAULES</i>	17
<i>ÍNDEX DE FIGURES</i>	19
<i>ABREVIATURES MÉS UTILITZADES</i>	21
<i>INTRODUCCIÓ GENERAL</i>	23
1. <i>Els folats</i>	25
2. <i>Funció dels folats</i>	30
3. <i>Estat en folats alterat</i>	35
4. <i>Mesures preventives per preservar un estat òptim en folats</i>	37
5. <i>Transport dels folats</i>	40
5.1. <i>Sistema de transport per portador de folat reduït (RFC)</i>	41
5.2. <i>Sistema de transport per receptor de folat (RF)</i>	42
5.3. <i>Sistema de transport per transportador de folat acoblat a protó (PCFT)</i>	46
6. <i>Autoanticossos pels receptors de folat</i>	48
<i>HIPÒTESI I OBJECTIUS</i>	59
<i>MATERIAL I METODOLOGIA</i>	63
1. <i>Material</i>	65
1.1. <i>Subjectes</i>	65
<i>Estudi Poblacional</i>	65
<i>Estudi PreC</i>	67
<i>Estudi NUTCIR</i>	70
1.2. <i>Aspectes ètics</i>	71
2. <i>Metodologia</i>	72
2.1. <i>Obtenció de les fraccions sanguínies d'interès</i>	72
2.2. <i>Extracció d'ADN a partir de mostres leucocitàries congelades</i>	74
2.3. <i>Determinació de la homocisteïna plasmàtica total en dejú (tHcy)</i>	76
2.4. <i>Determinació dels folats plasmàtics i eritrocitàris</i>	76
2.5. <i>Determinació de cobalamina (Cbl) plasmàtica</i>	77
2.6. <i>Determinació de la proteïna C-reactiva (CRP)</i>	77
2.7. <i>Determinació de la creatinina plasmàtica</i>	77

	<i>Pàgina</i>
<i>2.8. Determinació de la cotinina plasmàtica</i>	78
<i>2.9. Determinació del polimorfisme 677C→T del gen 5,10-metilètetrahidrofolat reductasa (MTHFR)</i>	78
<i>2.10. Anàlisi estadística.</i>	78
CAPÍTOL 1. DETECCIÓ D'AUTOANTICOSSOS CONTRA I D'UNIÓ DE RECEPTORS DE FOLAT	79
<i>1. Introducció</i>	81
<i>2. Objectiu particular</i>	83
<i>3. Purificació de receptors de folat</i>	83
<i>3.1. Primera Purificació</i>	84
<i>3.2. Segona Purificació</i>	87
<i>3.3. Quantificació de la purificació de receptors de folat</i>	87
<i>4. Assaig de detecció d'autoanticossos contra receptors de folat (Tècnica del "blocking")</i>	93
<i>5. Assaig de detecció d'autoanticossos d'unió de receptors de folat (Tècnica del "binding")</i>	99
<i>6. Discussió</i>	108
CAPÍTOL 2. AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT A LA POBLACIÓ	113
<i>1. Introducció</i>	115
<i>2. Hipòtesi i Objectius particulars</i>	116
<i>3. Disseny de l'estudi</i>	116
<i>4. Anàlisi estadística</i>	117
<i>5. Resultats</i>	120
<i>6. Discussió</i>	123
CAPÍTOL 3. AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT DURANT LA PRECONCEPCIÓ I DURANT L'EMBARÀS	127
<i>1. Introducció</i>	129
<i>2. Hipòtesi i Objectius particulars</i>	130
<i>3. Disseny de l'estudi</i>	131
<i>4. Anàlisi estadística</i>	133
<i>5. Resultats</i>	133
<i>6. Discussió</i>	135
CAPÍTOL 4. AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT EN COMPLICACIONS DE L'EMBARÀS	141
<i>1. Introducció</i>	143
<i>2. Hipòtesi i Objectius particulars</i>	144

	<i>Pàgina</i>
<i>3. Disseny de l'estudi</i>	145
<i>4. Anàlisi estadística</i>	147
<i>5. Resultats</i>	149
<i>6. Discussió</i>	157
<i>DISCUSSIÓ GENERAL</i>	163
<i>CONCLUSIONS</i>	171
<i>REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES</i>	175
<i>APORTACIONS CIENTÍFIQUES</i>	193
<i>Articles científics</i>	195
<i>Contribucions a Congressos</i>	195
<i>Premis</i>	196
<i>Altres d'interès</i>	196
<i>ANNEXES</i>	197
<i>ANNEX 1: PROTOCOLS PER LA PREPARACIÓ DE REACTIUS</i>	199
<i>ANNEX 2: ENQUESTES D'HÀBITS I ESTIL DE VIDA DE L'ESTUDI NUTCIR</i>	215
<i>ANNEX 3: ARTICLES CIENTÍFICS</i>	221
<i>ANNEX 4: MATERIAL RELATIU A L'ESTUDI NUTCIR</i>	233

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

ÍNDEX DE TAULES

	<i>Pàgina</i>
TAULA 1. Revisió bibliogràfica sobre autoanticossos contra receptors de folat, la contribució d'aquesta tesi i investigació futura.	58
TAULA 2. Esquema de l'assaig de la mostra pre-matriu i resultats obtinguts.	87
TAULA 3. Esquema de l'assaig de la mostra post-matriu i resultats obtinguts.	88
TAULA 4. Esquema de l'assaig dels eluats de la purificació de receptors de folat.	92
TAULA 5. Resultats obtinguts en la tècnica del <i>blocking</i> en 14 mostres.	98
TAULA 6. Característiques dels hàbits d'estil de vida i dietètics i, estat en vitamines en no portadors i portadors d'autoanticossos contra receptors de folat.	120
TAULA 7. Resum dels models de regressió lineal múltiple.	122
TAULA 8. Característiques basals dels casos i controls per subfertilitat i per avortament espontani.	134
TAULA 9. Resum de les titulacions d'autoanticossos contra receptors de folat en dones amb titulacions positives en almenys una ocasió.	135
TAULA 10. Característiques generals, d'hàbits i estil de vida en no portadores i portadores d'autoanticossos contra receptors de folat en algun moment de l'embaràs.	150
TAULA 11. Descripció de les mostres positives per autoanticossos contra receptors de folat en cada moment estudiat de l'embaràs i al cordó.	151
TAULA 12. Característiques dels embarassos en les no portadores i portadores d'autoanticossos contra receptors de folat en algun moment de l'embaràs.	152
TAULA 13. Mitjanes de les determinacions bioquímiques en no portadores i portadores d'autoanticossos contra receptors de folat en algun moment de l'embaràs per les mostres maternes i del cordó.	153
TAULA 14. Resum dels models de regressió lineal múltiple.	156
TAULA 15. Relació de volums mínims necessaris de tampó rentat utilitzat en la tècnica del <i>binding</i> .	213

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

ÍNDEX DE FIGURES

	<i>Pàgina</i>
FIGURA 1. Estructura molecular de l'àcid pteroilglutàmic (àcid fòlic).	25
FIGURA 2. Esquema de la glutamat carboxipeptidasa II.	27
FIGURA 3. Cicle dels folats.	30
FIGURA 4. Cicle de la metionina.	32
FIGURA 5. Vies metabòliques implicades en el metabolisme de la homocisteïna.	33
FIGURA 6. Ruta de la transulfuració.	34
FIGURA 7. Resum de les titulacions mitjanes obtingudes en l'estudi d'intervenció de Ramaekers i els seus col·laboradors (2008). ²⁰⁵	55
FIGURA 8. Disseny de reclutament de voluntaris de l'Estudi Poblacional.	66
FIGURA 9. Disseny de l'Estudi PreC.	69
FIGURA 10. Disseny de l'Estudi NUTCIR.	71
FIGURA 11. Fraccions sanguínies obtingudes a partir de cada tub d'extracció i determinacions bioquímiques i genètiques realitzades a partir de cada fracció.	73
FIGURA 12. Esquema del receptor de folat.	82
FIGURA 13. Bateria de dilucions dels tres primers eluats obtinguts en la purificació de receptors de folat.	91
FIGURA 14. Preparació de la mostra per la tècnica del <i>blocking</i> .	95
FIGURA 15. Tècnica del <i>blocking</i> .	96
FIGURA 16. Reacció d'unió del receptor de folat a la superfície dels pous de la placa d'ELISA.	100
FIGURA 17. Revestiment dels pous de la placa d'ELISA.	101
FIGURA 18. Tècnica del <i>binding</i> .	103
FIGURA 19. Reacció del <i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i> .	105
FIGURA 20. Reacció de l'àcid clorhídric.	105
FIGURA 21. Esquema de treball a seguir en l'ús de la placa d'ELISA.	106
FIGURA 22. Reacció del <i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i> en els diferents controls.	107
FIGURA 23. Possibles llocs d'unió dels autoanticossos pel receptor de folat.	109
FIGURA 24. Diagrama de selecció de individus de l'Estudi Poblacional i dades utilitzades.	117

	<i>Pàgina</i>
FIGURA 25. Risc de ser portador d'autoanticossos contra receptors de folat en cada quintil d'ingesta de llet comparat amb el quintil més baix.	123
FIGURA 26. Diagrama de reclutament de casos/controls per subfertilitat i per avortament espontani a partir dels Estudis PreC i NUTCIR.	131
FIGURA 27. Resum del número de mostres analitzades i dades disponibles de l'estudi NUTCIR.	146
FIGURA 28. Representació de les concentracions mitjanes de folat i cobalamina plasmàtiques i homocisteïna plasmàtica total en dejú de les mostres maternes, en portadores i no portadores d'autoanticossos contra receptors de folat i, nivells de significació de l'ANOVA de mesures repetides.	155

ABREVIATURES MÉS UTILITZADES

<i>Acrònim</i>	<i>Significat</i>
5-MTHF	5-metiltetrahidrofolat
AE	Avortament espontani
APG	Àcid pteroilglutàmic
Cbl	Cobalamina
CPM	Contatges/emissions per minut
CRP	Proteïna C-reactiva
DE	Desviació estàndard
DFC	Deficiència de folat cerebral
DTN	Defectes del tub neural
FBP	Proteïna lligant de folat
FLP	Fenedura labial i/o palatina
GPI	Glucosilfosfadidilinositol
Hcy	Homocisteïna
HTL	Homocisteïna-tiolactona
MTHFR	Metilètetrahidrofolat reductasa
OR	Odds ratio
PCFT	Transportador de folat acoblat a protó
RF	Receptor de folat
RFC	Portador de folat reduït
tHcy	Homocisteïna plasmàtica total en dejú
THF	Tetrahidrofolat

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009



INTRODUCCIÓ GENERAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

INTRODUCCIÓ GENERAL

L'objectiu d'aquesta introducció general és que el lector tingui una àmplia visió de la naturalesa, les funcions i el transport dels folats, des del punt de vista de la salut pública; per així posteriorment entendre millor l'efecte de la presència d'autoanticossos pels receptors de folat. La conseqüència de la presència d'aquests sobre l'estat en folats i les repercussions per a la salut és analitzada en tres escenaris; en una població general, durant la preconcepció i l'embaràs i, en relació a l'evolució de l'embaràs i el desenvolupament del fetus (CAPÍTOLS 2, 3 i 4). Cadascun d'aquests capítols incorpora una petita introducció més específica.

1. Els Folats

La paraula "folats" és el nom genèric que rep el conjunt de derivats biològicament actius i reduïts de l'àcid pteroilglutàmic (APG), presents de forma natural en alguns aliments (per exemple, fetge, carn de vedella, llegums, verdura verda i fruits secs són fonts alimentàries riques en folats). L'estructura bàsica d'aquesta vitamina, consta d'un anell pteridina (2-amino-4-hidroxi-6-metilpteridina) unit a l'àcid p-aminobenzoic i a un àcid glutàmic (FIGURA 1). Aquesta forma totalment oxidada és coneguda com àcid fòlic.

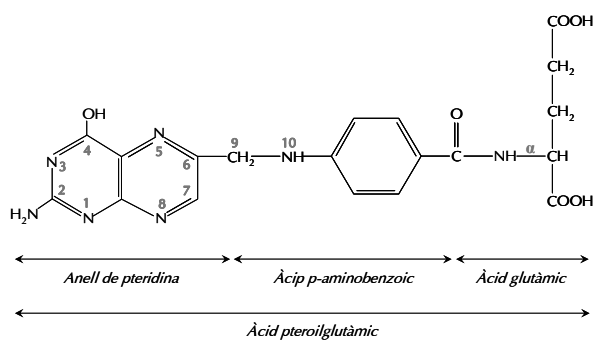


FIGURA 1. Estructura molecular de l'àcid pteroilglutàmic (àcid fòlic).

Els folats procedents dels aliments normalment es troben com una barreja de diferents formes poliglutamades. A través del pas pel cicle dels folats es produeixen diferents substitucions bioquímiques, amb la conseqüent aparició de diverses formes reduïdes de folat. Les diferents formes de folat són sensibles a l'oxigen i a pH extrems. En general les formes reduïdes són més inestables que les formes oxidades. L'àcid fòlic és la forma sintètica utilitzada en suplementos nutricionals i d'aliments fortificats, degut al seu caràcter oxidat i per la seva estructura monoglutamada. L'àcid folínic és el nom comú pel que es coneix la forma de folat 5-formiltetrahidrofolat. A diferència de l'àcid fòlic, té una estructura bioquímica que li proporciona una major estabilitat al procés d'oxidació, i per tant més estable que l'àcid fòlic. L'àcid folínic té major capacitat de travessar la barrera hemato-encefàlica que l'àcid fòlic.

El procés d'absorció dels folats provinents de la dieta té lloc a la mucosa de l'intestí prim. Les formes poliglutamades presenten major dificultat per travessar la mucosa intestinal. Per afavorir l'absorció, la cadena de glutamats és deconjugada per hidròlisi, a formes més senzilles (monoglutamades). L'enzim responsable d'aquest metabolisme és una metal·loproteasa dependent de zinc anomenada glutamat carboxipeptidasa II (GCPII) (FIGURA 2).¹⁻⁵

Les formes monoglutamades que resulten de l'acció de la GCPII són transportades cap a l'interior dels enteròcits. Clàssicament s'ha descrit a la literatura la presència de dos tipus de sistemes de transport implicats. Un sistema saturable a través d'una proteïna ancorada a la membrana plasmàtica dels enteròcits que uneix les formes de folat amb alta afinitat (rang nM);⁶ i un sistema no-saturable a través de proteïnes transmembranals caracteritzat per una menor afinitat per les formes de folat (rang µM).⁷ El sistema no-saturable, contribueix a l'absorció de folats quan la seva concentració al lumen és molt alta. Aquest sistema però, en situacions d'administració de dosis farmacològiques altes d'àcid fòlic pot saturar-se.⁸ Com a conseqüència, l'àcid fòlic no reduït passa a la circulació portal.⁹ Quan aquest sigui captat per les cèl·lules, mitjançant la dihidrofolat reductasa serà reduït a dihidrofolat (DHF) i tetrahidrofolat (THF). Ha estat demostrat *in vitro* que una sobredosi d'àcid fòlic a llarg termini, porta a un descens significatiu de la regulació específica dels

processos de reabsorció a nivell intestinal i renal.¹⁰ Recentment s'ha descrit un nou sistema de transport, acoblat al transport de protons¹¹ que localitzat al duodè desenvoluparia el paper principal d'absorció de folats. Més endavant s'entra en detall en aquests tres sistemes de transport. El pH intestinal és un dels factors condicionants en el transport de folats a través de la paret intestinal.

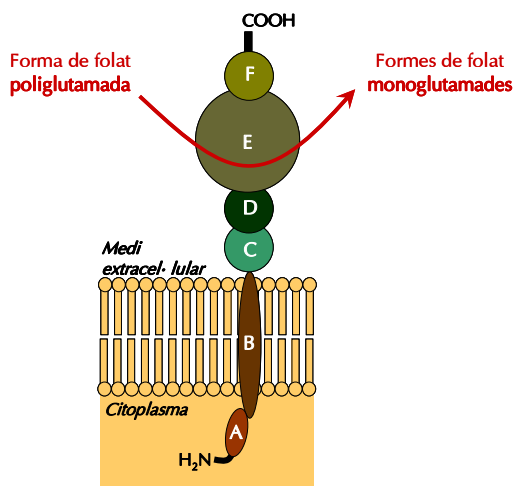


FIGURA 2. Esquema de la glutamat carboxipeptidasa II.

Format per 6 dominis: un intracel·lular (A), un transmembranal (B) i 4 extracel·lulars (C, D, E, F). El domini E és el responsable de l'activitat catalítica de l'enzim. Imatge de Rawlings i Barret, 1997³

Una vegada dins l'enteròcit, es produeix un procés de conjugació, per tal que els folats absorbits quedin retinguts a l'interior de la cèl·lula. Una part d'aquests passen a la circulació portal per ser transportats fins als teixits que els requereixen. Prèviament però, seran transformats: deconjugació a monoglutamats, reducció a THF i unió d'un grup metil convertint-se en 5-metiltetrahidrofolat (5-MTHF). La forma 5-MTHF és la forma de folat majoritària que es troba al torrent sanguini, de la qual la meitat és transportada unida de forma inespecífica amb l'albumina.¹² L'altra part des de la circulació portal viatja fins al fetge. El fetge els desmetila i els conjuga de nou

per tal d'emmagatzemar-los. Part d'aquesta reserva hepàtica de folats és secretada a la bilis, amb els canvis necessaris per poder-se donar el seu alliberament. I de la bilis poden tornar a ser reabsorbits de nou per la mucosa intestinal.¹³ Els folats restants de la filtració glomerular, són reabsorbits al túbul renal proximal. Aquest últim és un procés saturable i hi ha involucrats sistemes de transport mediat per receptors de folat principalment.¹⁴ Els folats seran dividits per la unió C9-N10 de la seva estructura, seguit de la hidròlisi de la cadena poliglutamada i finalment N-acetilats. La proporció d'aquests derivats a l'orina és menor en referència a la quantitat ingerida de folats. La fracció de folats excretats a través de les femtes és variable, ja que un percentatge d'aquests són produïts per la microflora intestinal. Per aquesta raó, l'excreció fecal en folats no és considerada en l'avaluació de la biodisponibilitat dels folats.

El terme biodisponibilitat dels folats fa referència a la fracció de folats ingerits que són absorbits i que resten disponibles pels diferents mecanismes metabòlics en els que estan implicats i pel seu emmagatzemament.¹⁵⁻¹⁸ Són molts els factors que contribueixen a la biodisponibilitat final dels folats. La pròpia naturalesa de la vitamina és un d'ells, essent les formes naturals poliglutamades les menys estables.¹⁹ La integritat de l'estructura de la cèl·lula vegetal influirà en l'alliberament dels folats que conté.²⁰ La hidròlisi de les formes poliglutamades, i el pH òptim pel correcte funcionament de la GCPII seran factors limitants de la deconjugació de folats poliglutamats necessària per la correcta absorció intestinal. Així com la presència de compostos que inhibeixen l'activitat de la GCPII.^{21,22} Altres components de la dieta afavoriran l'estabilitat dels folats durant la digestió, com és la presència de proteïnes lligadores de folat a la llet.²³ S'han descrit polimorfismes en la GCPII que podrien afectar la seva activitat i en conseqüència la seva funció, tot i que els resultats són contradictoris.^{24,25} S'ha de considerar l'alta sensibilitat dels folats front l'oxidació, de manera que els processos de recollida, emmagatzematge, cocció i preparació dels aliments que els contenen, contribueixen al total de pèrdues que finalment definiran la biodisponibilitat dels folats.²⁶ També s'han descrit els efectes nocius d'alguns fàrmacs antiinflamatoris, anticonvulsius, el consum crònic d'aspirina i d'altres salicilats sobre el resultat final de la biodisponibilitat en folats.⁸ Tots aquests factors són reconeguts com a factors influents sobre la biodisponibilitat dels folats, però

aquesta és una qüestió difícil de resoldre degut al elevat número de factors que s'han de tenir en compte.

Tant el consum de formes monoglutamades com poliglutamades de folats augmenten la concentració de folat plasmàtic.²⁷ Però la biodisponibilitat dels folats i de l'àcid fòlic és diferent. L'àcid fòlic quan és consumit de forma aïllada (en forma de suplement vitamínic) és absorbit gairebé al 100%.^{15,28} Aquest percentatge però, es redueix a un 85% quan l'àcid fòlic és consumit junt amb aliments (aliments fortificats).^{28,29} I els folats tenen la meitat (50%) de biodisponibilitat respecte la biodisponibilitat de l'àcid fòlic com a suplement.³⁰ L'estat en folats d'un individu variarà depenent de si l'aportació d'aquesta vitamina és a través de la dieta (folats) o a través de la suplementació o fortificació (forma sintètica).²⁸ La implantació de l'obligatorietat de fortificació amb àcid fòlic als EEUU al 1998³¹, va portar a plantejar la problemàtica de com calcular els requeriments en folats necessaris. Diversos estudis han avaluat l'estat en folats en diferents grups poblacionals. Uns estudis es basaven en el consum de folats naturals^{30,32} mentre que d'altres en la combinació de folats i àcid fòlic.³³⁻³⁶ Per tal de poder calcular de forma precisa els requeriments fisiològics en folats es va buscar una mesura que contemplés els diferents percentatges de biodisponibilitat de les diverses formes de folats i àcid fòlic. Aquesta mesura són els equivalents dietètics de folat (EDF).^{18,37-39} Els EDF corresponen a la suma de μg de folats més el producte de 1.7 [resultat del quocient entre la biodisponibilitat d'àcid fòlic consumit amb aliments (85%) i la biodisponibilitat dels folats naturals (50%)] per μg d'àcid fòlic. Aquesta mesura no serà necessària quan la font de la vitamina sigui exclusivament alimentaria (folats), doncs en aquest cas, el número de μg de folats naturals equival al número de μg de EDF. Però serà rellevant en els casos en què es consumeixen aliments rics en folats naturals en combinació amb aliments fortificats amb àcid fòlic. Altres estudis han demostrat que el percentatge de biodisponibilitat dels folats és major,^{40,41} fet que faria replantejar el càlcul d'EDF. Clàssicament les taules de composició d'aliments s'expressaven en μg per cada 100 g d'aliment; però cada vegada més s'utilitzen els EDF⁴² - sobretot en països amb la fortificació amb àcid fòlic implementada -, tal com recomana l'Institut de Medicina.³⁷ Les recomanacions són d'entre 150-300 μg d'EDF/dia en nens i 400

μg d'EDF/dia en adolescents (a partir dels 14 anys) i adults, 600 μg d'EDF/dia en gestants i 500 μg d'EDF/dia durant la lactància.

2. Funció dels Folats

La principal funció metabòlica dels folats consisteix en la transferència de grups metils (unitats d'un carboni, o grups monocarbonats) a les vies metabòliques imprescindibles per la síntesi d'aminoàcids i àcids nucleics. El cicle dels folats (FIGURA 3) és responsable de l'aportació d'aquestes unitats de carboni.

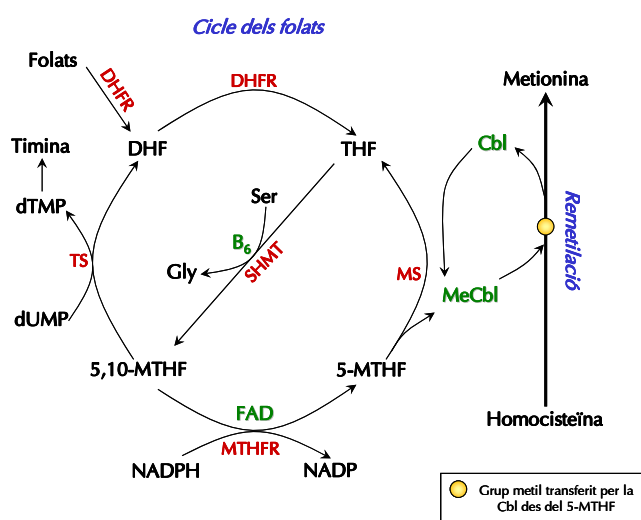


FIGURA 3. Cicle dels folats.

(*B₆*: piridoxal-5'-fosfat, *Cbl*: cobalamina, *DHF*: dihidrofolat, *DHFR*: dihidrofolat reductasa, *dTMP*: 5'-monofosfat de desoxitimidina, *dUMP*: 5'-monofosfat de desoxiuracil, *FAD*: flavina adenina dinucleòtid, *Gly*: glicina, *MeCbl*: metilcobalamina, *MTHFR*: 5,10-metilètetrahidrofolat reductasa, *MS*: metionina sintasa, *5-MTHF*: 5-metil-tetrahidrofolat, *5,10-MTHF*: 5,10-metilètetrahidrofolat, *NADP*: forma oxidada de la nicotiamida adenina dinucleòtid fosfat, *NADPH*: forma reduïda de la nicotiamida adenina dinucleòtid fosfat, *Ser*: serina, *SHMT*: serina hidroximetiltransferasa, *THF*: tetrahidrofolat, *TS*: timidilat sintasa). Esquema adaptat de Carmel i Jacobsen (2001)⁴³

La dihidrofolat reductasa redueix el folat a DHF, el qual alhora també està reduït pel mateix enzim a THF. A través de l'acció de la serina hidroximetiltransferasa, junt amb la serina, el THF és convertit a 5,10-metilètetrahidrofolat (5,10-MTHF) i la serina a glicina, on la piridoxal-5'-fosfat o vitamina B₆ actua com a coenzim. El 5,10-MTHF resulta imprescindible per la síntesi de 5'-monofosfat de deoxitimidina (dTMP) a partir de la timidilat sintasa (TS).

Però també és el substrat que mitjançant l'acció de la 5,10-metilètetrahidrofolat reductasa (MTHFR) amb la forma coenzimàtica de la riboflavina, la flavina adenina dinucleòtid (FAD), és convertida a 5-MTHF. Aquest producte és el responsable últim de transferir unitats d'un carboni imprescindibles per la remetilació de la homocisteïna (Hcy) a metionina, a través de la metionina sintasa (MS).

Un dels passos més estudiats del cicle dels folats ha estat el de la reducció del 5,10-MTHF a 5-MTHF. Han estat descrites diferents mutacions en el gen codificant de la MTHFR humana.⁴⁴ Però el més estudiat ha estat el polimorfisme 677C→T *MTHFR*,⁴⁵ localitzat al cromosoma 1p36.3. Aquest polimorfisme consisteix en la transició d'una citosina (C) per la timina (T) a la posició 677 de l'exó 4 d'aquest gen. El resultat és la substitució de l'aminoàcid alanina per una valina a la posició 222 de la cadena proteica, localitzat al domini catalític de l'enzim. La conseqüència de la presència d'aquest polimorfisme és la disminució de l'activitat específica de l'enzim del 35% en els individus heterozigots (CT) i del 70% en homozigots (TT).⁴⁵ Aquest polimorfisme afavoreix la dissociació de la FAD de l'enzim MTHFR limitant la seva capacitat coenzimàtica,⁴⁶ i en condicions d'estat subòptim en folats i riboflavina s'ha demostrat el descens de producció de 5-MTHF.⁴⁷ En conseqüència, hi ha una reducció de l'aportació de grups monocarbonats necessaris per la metilació de la homocisteïna (Hcy).^{48,49} Els individus portadors d'aquest polimorfisme tenen majors requeriments en folats⁵⁰ i concentració d'homocisteïna total plasmàtica en dejú (tHcy) elevada en el cas de no assolir aquests requeriments. Un estat nutricional òptim en folats és imprescindible, però en el cas dels individus TT per la 677C→T *MTHFR* l'estat en riboflavina és també un factor limitant.⁵⁰

El carboni alliberat al cycle dels folats és captat per la MS⁵¹ i el transfereix a través de la cobalamina (Cbl).⁵² La transferència d'aquest grup es produeix en dues fases. En la primera, el 5-MTHF allibera un grup metil que és transferit a la Cbl que actua de cofactor generant-se THF i metilcobalamina. Finalment, la metilcobalamina transfereix el grup monocarbonat a la Hcy per la seva remetilació, generant-se metionina i Cbl de nou, que tornarà a estar disponible per transferir nous grups monocarbonats. El THF que es forma estarà disponible per la síntesi de nucleòtids a través de la seva conversió a 5,10-MTHF i finalment a dTMP. La metionina formada de la metilació de la Hcy entra al cycle de la metionina (FIGURA 4).

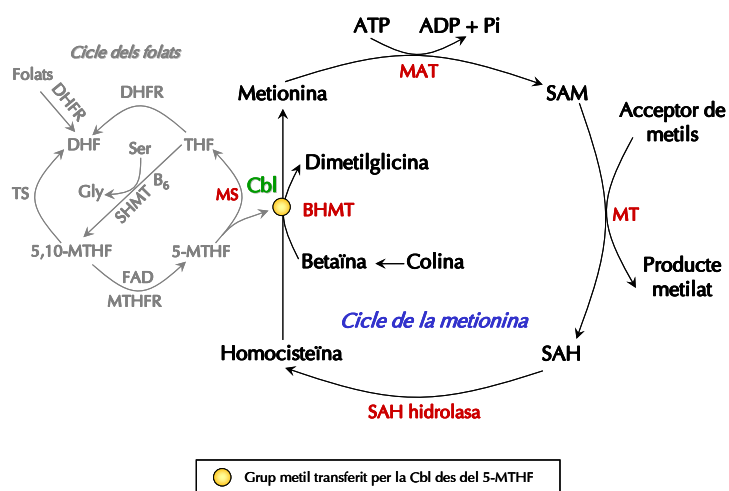


FIGURA 4. Cycle de la metionina.

(ADP: adenosina difosfat, ATP: adenosina trifosfat, BHMT: betaïna-homocisteïna metiltransferasa, Cbl: cobalamina, MAT: metionina adenosiltransferasa, MS: metionina sintasa, MT: metiltransferasa, Pi: grup fosfat, SAH: S-adenosil homocisteïna; SAM: S-adenosil metionina. Les abreviatures del cycle dels folats s'han descrit a la FIGURA 7). Esquema adaptat de Carmel i Jacobsen (2001) ⁴³

Aquest cycle està present en tots els tipus cel·lulars, amb la funció principal d'aportar metils a les nombroses reaccions de transmetilació; entre elles la metilació de l'ADN. Aquesta metilació és imprescindible per la regulació epigenètica de l'expressió

genètica diferencial en els diversos teixits.⁵³ A través de la metionina adenosiltransferasa (MAT) es transfereix un grup adenosil procedent de l'adenosina trifosfat (ATP) a l'àtom sulfur de la metionina, convertint-se en S-adenosil-metionina (SAM). La SAM actua com a donador de metils a qualsevol molècula definida com receptora de grups metil (incloent proteïnes, fosfolípids i ADN entre d'altres) a través d'una reacció de transmetilació, convertint-se en S-adenosil-homocisteïna (SAH). Finalment la SAH serà hidrolitzada de nou a Hcy.

La Hcy és un aminoàcid sulfur metabolitzat a través de dues vies metabòliques principals, la transulfuració i la remetilació⁵⁴ (FIGURA 5).

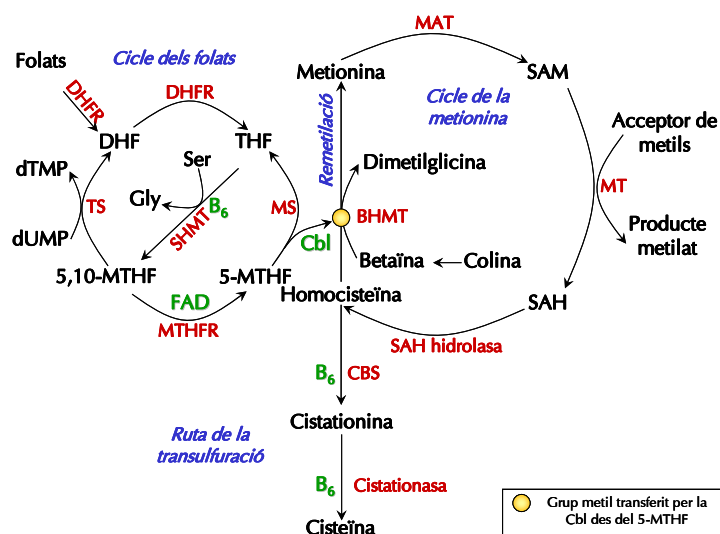


FIGURA 5. Vies metabòliques implicades en el metabolisme de la homocisteïna.

(B_6 : piridoxal-5'-fosfat, **BHMT**: betaïna-homocisteïna metiltransferasa, **Cbl**: cobalamina, **CBS**: cistationa β -sintasa, **DHF**: dihidrofolat, **DHFR**: dihidrofolat reductasa, **dTMP**: 5'-monofosfat de desoxitimidina, **dUMP**: 5'-monofosfat de desoxiuracil, **FAD**: flavina adenina dinucleòtid, **Gly**: glicina, **MAT**: metionina adenosiltransferasa, **MT**: metiltransferasa, **MTHFR**: 5,10-metilètetrahidrofolat reductasa, **MS**: metionina sintasa, NF_4^+ : grup amoni, **SAH**: S-adenosil homocisteïna, **SAM**: S-adenosil metionina, **SHMT**: serina hidroximetiltransferasa, **Ser**: serina, **THF**: tetrahidrofolat, **TS**: timidilat sintasa, **5-MTHF**: 5-metilètetrahidrofolat, **5,10-MTHF**: 5,10-metilètetrahidrofolat). Esquema adaptat de Carmel i Jacobsen (2001)⁴³

En la remetilació de la Hcy, també està implicada la desmetilació de la betaïna o trimetilglicina a dimetilglicina a través de la betaïna-homocisteïna metiltransferasa dins la ruta d'oxidació de la colina⁵⁵ (FIGURES 4, 5). La font de grups monocarbonats provinents de la betaïna, té un paper important, en presència d'un estat vitamínic deficient o presència del polimorfisme 677C→T *MTHFR*.⁵⁶

La ruta de transulfuració (FIGURA 6) és l'encarregada de transferir el grup sulfur des de la metionina a la cisteïna. A través de la cistationina β -sintasa⁵⁷ i la forma coenzimàtica de la vitamina B₆, la Hcy junt amb la serina es condensa formant-se cistationina i seguit per la divisió de la cistationina per actuació de la cistationa γ -liasa (cistationasa) amb l'ajuda de la vitamina B₆ com a cofactor, generant-se cisteïna.

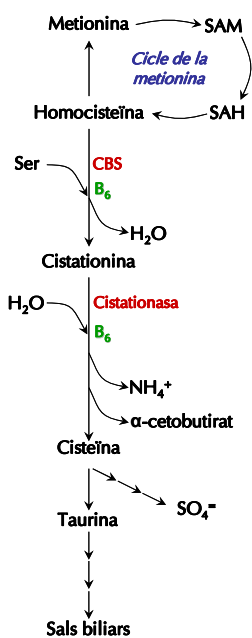


FIGURA 6. Ruta de la transulfuració.

(B₆: piridoxal-5'-fosfat (forma coenzimàtica de la vitamina B₆, CBS: cistationina β -sintasa, cistationasa: també anomenada cistationina γ -liasa, NH₄⁺: grup amoni, Ser: serina). Esquema adaptat de Brosnan i Brosnan (2006)⁵⁸

Són factors determinants del metabolisme de la Hcy, tots els components genètics⁵⁹ i nutricionals⁶⁰ involucrats en el cicle dels folats, la remetilació i la transulfuració. Per tant, un estat deficient en el component vitamínic, o l'alteració genètica d'alguns dels enzims implicats, es tradueix en un desequilibri en els valors normals de la concentració de Hcy.

3. Estat en folats alterat

El dèficit en folats implica la reducció de totes les formes de folat del cicle dels folats. El descens de 5,10-MTHF impedeix la seva oxidació a DHF, veient-se compromès un dels punts metabòlics imprescindibles per la síntesi de dTMP i conseqüentment la replicació de l'ADN. La inhibició de la síntesi d'ADN afecta a tots aquells teixits amb un alt índex de recanvi cel·lular, com l'epiteli bucal, el intestinal i el de la pell. Però resulta particularment sensible la sèrie eritroblàstica.⁶¹ La conseqüència final, és la megaloblastosi cel·lular – alteracions morfològiques dels eritroblasts definides com l'increment de volum cel·lular i l'aturada de la maduració del nucli en la fase S del cicle cel·lular⁶² – acabant desapareixent a la medulla òssia abans de que es produeixi la maduració de l'eritròcit. És el que es coneix com anèmia megaloblàstica. A la medulla òssia també es poden veure afectades les sèries granulopoiètica i megacariocítica amb el resultat de leucopenia i plaquetopenia, respectivament.⁶³

L'aportació subòptima en folats, redueix la transferència d'unitats monocarbonades necessàries per remetil·lar la Hcy, i per tant es produeix un augment a la concentració sanguínia d'aquesta. Si a més, se li suma l'activitat reduïda de la MTHFR per la presència de l'alel T pel polimorfisme 677C→T *MTHFR*, present en un 17.5% en la forma homozigot entre la nostra població,⁶⁴ la conseqüència final serà un increment de la homocisteïna total plasmàtica en dejú (tHcy). La tHcy elevada és un factor de risc independent per malaltia cardiovascular.⁶⁵ Una concentració elevada en aquest aminoàcid també ha estat relacionada amb diferents complicacions de l'embaràs,^{66,67} i amb càncer.⁶⁸

Tant un estat deficitari com en excés en folats comporta un desequilibri en la funció de metilació de l'ADN i en l'aportació de desoxinucleòtids (dNTD) per la síntesi *de novo* d'ADN. L'alteració d'aquestes funcions s'ha descrit com a possibles causes inductores de carcinogènesi.⁶⁹⁻⁷⁴ Un dels canvis epigenètics que es produeixen a l'ADN sintetitzat és l'addició d'un grup metil al carboni 5' de l'anell citosina, dels dNTD citosina-guanina. Les regions promotores o les de transcripció (exons) properes al promotor, contenen alt contingut en aquests dNTD, anomenades "illes CpG". L'ADN-metiltransferasa és la responsable d'aquesta metilació, a través de la transferència d'un grup metil per part de la SAM en el cicle de la metionina. La metilació d'aquestes illes CpG, s'associa a la inhibició de la transcripció en el control de l'expressió gènica. La hipometilació de CpG silenciaria l'expressió de gens supressors de tumors i eliminaria la inhibició transcripcional de l'expressió gènica d'oncogens, amb la conseqüent transformació maligne de la cèl·lula. També s'ha descrit l'alteració del control transcripcional en gens implicats en la reparació d'errors de l'ADN, apoptosi i diferenciació.^{70,73} I en presència d'un descens de la producció de timina (cicle dels folats), en el procés de síntesi d'ADN, la cèl·lula incorporarà de forma errònia uracils en lloc de timines.⁷⁵ La conseqüència és l'aparició de llocs fràgils sensibles als talls de doble cadena per part dels mecanismes de reparació, per tal d'eliminar els uracils incorporats. El major grau d'ús dels mecanismes de reparació que ha de fer la cèl·lula, incrementa la probabilitat que hi hagi errors en alguns dels punts del procés. S'ha comprovat *in vitro* que els trencaments de doble cadena d'ADN, incrementen el risc de transformació cel·lular i per tant de càncer.

El desequilibri en qualsevol dels components del metabolisme d'un carboni pot representar un risc potencial en la transformació cel·lular. Així s'ha observat entre individus amb genotip 677TT *MTHFR* amb un descens de metilació en leucòcits de sang perifèrica.^{76,77} L'edat també sembla ser un factor influent sobre els mecanismes responsables de preservar la integritat i l'estabilitat del material genètic.^{78,79}

Una conseqüència del dèficit en folats extensament estudiada, ha estat la seva associació amb el risc de patir embarassos afectats per defectes del tub neural (DTN).⁸⁰⁻⁸² Sota la denominació de DNT, s'agrupa un conjunt de malformacions

estructurals produïdes durant el procés d'organogènesi en el període embrionari.⁸³ Entre els dies 21-28 de gestació es produeix el tancament del tub neural. La conseqüència d'una anomalia en aquest procés, és l'aparició d'un DTN. Existeixen diferents tipus de DTN, depenent de la localització del tub neural alterada i del número d'estructures anatòmiques implicades. Els tipus de DTN més greus són l'anencefalia i l'espina bífida, amb afectació de l'extrem cranial del tub neural i la regió lumbosacral del tub neural, respectivament. L'anencefalia es caracteritza per l'absència o el desenvolupament anòmal d'una gran part del cervell i de la bòveda cranial. Els nadons amb anencefalia neixen morts o moren al poc temps. Existeixen diferents tipus d'espina bífida que varien entre formes més lleus com l'espina bífida oculta en què només estan afectats els arcs vertebrals posteriors fins a l'espina bífida tancada o l'espina bífida oberta acompanyats de seqüeles més greus.^{revisat per 83,84}

Diversos factors de risc per DTN han estat descrits. S'ha descrit la seva associació amb factors genètics, tots ells implicats en el metabolisme dels folats o del seu transport.^{revisat per 85 i 86} També s'han descrit factors de risc com el nivell socioeconòmic, el geogràfic i l'ètnia. L'etiologia causant dels DTN s'ha de considerar un factor multifactorial amb components genètic i ambiental. Tot i que es coneix l'efecte preventiu dels folats^{87,88} es desconeix quin és el mecanisme pel qual actuarien. Però no hi ha dubte que l'alta taxa de divisió cel·lular que té lloc durant les primeres etapes de desenvolupament embrionari, requereix un correcte estat en folats. Fins la data la suplementació amb àcid fòlic durant el període periconcepcional és l'eina més útil en la prevenció primària dels DTN.^{87,88}

4. Mesures preventives per preservar un estat òptim en folats

En base a la demostrada efectivitat preventiva de la suplementació amb àcid fòlic en la reducció de la incidència⁸⁷ i la recurrència⁸⁸ de DTN, alguns països han establert com a objectiu reduir la taxa de casos de DTN, dins els seus programes sanitaris de prevenció primària. Els casos de DTN amb una elevada morbi-mortalitat associada suposen un elevat cost socio-sanitari i una càrrega important per la família afectada. Tres són les estratègies per millorar l'estat nutricional en folats: fomentar l'increment

de la ingesta d'aliments amb alt contingut en folats en combinació amb suplementes d'àcid fòlic, la fortificació voluntària d'alguns aliments amb àcid fòlic i la fortificació amb caràcter obligatori amb àcid fòlic d'un aliment bàsic. Cadascuna d'aquestes estratègies poden aportar el benefici que es persegueix, però també comporten unes limitacions.⁸⁹

Tot i que les mesures de campanyes informatives i educatives a favor de l'ús diari de suplementes d'àcid fòlic, dirigides a la població femenina que vol tenir descendència, són efectives,^{90,91} són lentes en l'aparició de l'èxit perseguit, sovint no arriben de forma homogènia al sector poblacional a la que van dirigides,^{92,93} o no són utilitzades al nivell desitjat.⁹⁴ Les campanyes a favor de l'increment del consum d'aliments rics en folats, tampoc ha obtingut bons resultats.^{95,96} I és que l'èxit de tota mesura en l'àmbit de la salut pública, que impliqui un canvi d'actitud en els hàbits saludables, és lent i sovint no s'aconsegueix l'efectivitat esperada inicialment. En el fracàs d'aquestes mesures s'han de considerar els embarassos no planificats.⁹⁷ En aquests casos quan la dona s'assabenta que està embarassada, el període crític de risc d'aparició de DTN (3^a-4^a setmana de gestació) ja ha passat, de manera que tot i iniciar la suplementació amb àcid fòlic, aquest no tindrà l'efecte preventiu desitjat. L'estat socio-econòmic precari per poder optar als suplementes d'àcid fòlic en alguns països⁹⁸ i, el baix compliment de les recomanacions^{97,99} són factors que s'han tingut en consideració. El fracàs obtingut en les diferents mesures preventives, les altes despeses mèdiques anuals que genera un cas de DTN i la favorable relació benefici/risc de la fortificació,^{100,101} ha fet decidir a molts països adoptar la fortificació obligatòria d'un aliment bàsic amb àcid fòlic, com a eina útil per reduir la taxa de DTN. El país pioner en la implantació d'aquesta mesura va ser EEUU. La *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) va recomanar la fortificació de productes de gra amb 140 µg d'àcid fòlic per cada 100 g de farina de blat al març de 1996,³¹ entrant a ser obligatorietat des del gener de 1998. Al 2007, un total de 52 països havien adoptat regulacions nacionals en referència a la fortificació amb àcid fòlic.¹⁰² Espanya no està inclosa en aquest grup de països.

El descens de casos de DTN ha estat entre el 19-26% a EEUU,¹⁰³⁻¹⁰⁵ entre el 46-51% a Xile,¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ del 36% a Costa Rica,¹¹⁰ entre el 19-31% a Austràlia i Nova Zelanda,⁹² i del 40-50% a Canadà.^{99,111-113} La fortificació ha aportat millores en l'estat nutricional en folats a tota la població, incrementant les concentracions de folat plasmàtic i eritrocitari i reduint la concentració de tHcy.^{98,110,112,114-119} L'efecte de la fortificació s'ha estabilitzat fins el punt que la falta de folats a nivell poblacional ja no és la causa de DTN entre aquests països. Els estudis més recents comproven que la millora en l'estat en folats aconseguida durant els anys immediats a la implantació de la fortificació a EEUU, ha arribat a un *plateau*. De forma general s'ha produït un descens general de la tHcy¹²⁰ però aquest ritme de descens ha experimentat una desacceleració, experimentant una estabilització en les concentracions de tHcy.¹²¹ S'ha proposat que aquest estancament en el descens de la tHcy es mantindrà fins que no augmenti la concentració de Cbl, necessària per la transferència dels grups monocarbonats extrems generats al cicle dels folats per la remetilació de la Hcy.¹²²

Entre els països de la Unió Europea, hi ha resistència general en adoptar com a mesura preventiva la fortificació obligatòria, tot i que hi ha països en què no és possible la interrupció legal de l'embaràs, com és el cas d'Irlanda i Polònia. Alguns països contempnen la fortificació voluntària amb àcid fòlic, com és el cas del Regne Unit¹²³ i Irlanda.¹²⁴ Al 2004, de la *First Conference of Folates: Analysis, Bioavailability and Health (EuroFoodFolate)*, van descriure els objectius que Europa hauria d'assolir, pel que fa a les recomanacions i als arguments referits a la fortificació obligatòria amb àcid fòlic, dirigits als governs de la Unió Europea.¹²⁵ La resistència general d'Europa a favor de la fortificació obligatòria es basa en els possibles efectes perjudicials sobre altres grups poblacionals. Aquest són la gent gran amb problemes d'absorció de Cbl. L'excés en folats comporta el risc d'emascarar els símptomes hematològics del dèficit en Cbl. Aquesta resistència també es basa en la diferent biodisponibilitat de les diferents formes de folats consumides, i el consum d'aquestes de forma aïllada o combinada amb aliments fortificats i/o suplementos vitamínics. Una altra de les preocupacions, es basa en el possible increment del risc de càncer, tot i que ha estat descrit el descens de la incidència de certs càncers infantils des de que va iniciar-se la fortificació a Estats Units.¹²⁶ Tot i l'evident funció preventiva dels folats en el risc de

càncer colo-rectal,¹²⁷ ha estat suggerit que l'excés en folats podria incrementar la progressió de tumors preexistents.¹²⁸

A Espanya el 1992, la *Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo*, va publicar les recomanacions a seguir en la prevenció dels DTN. Aquest organisme recomanava una dosi de 5 mg d'àcid fòlic al dia dividida en dues dosis al grup de risc, definides com aquelles dones amb familiars de fins a segon grau de parentesc amb algun tipus de DTN.¹²⁹ Dos anys més tard, aquestes recomanacions van ser modificades en quant al grup poblacional al que anaven dirigides. Es va incloure com a grup de risc a tota aquella dona que estigués pensant en quedar-se embarassada, però en especial aquelles que ja havien patit un embaràs complicat per DTN. La dosi d'àcid fòlic recomanada no es va modificar.¹³⁰ Finalment al 2001, les recomanacions eren dirigides a tota la població femenina amb intenció de tenir fills, però distingint entre les dones amb antecedents d'embarassos afectats per DTN i les que no. A les primeres se les recomana una dosi diària de 4 mg d'àcid fòlic, mentre que a les segones de 400 µg al dia.¹³¹ Actualment, a Espanya, no existeix la obligatorietat de fortificació amb àcid fòlic, però si que existeixen al mercat productes fortificats amb àcid fòlic, com per exemple els cereals d'esmorzar. El consum d'aquests és molt baix entre la població espanyola.¹³² I en referència al compliment de les recomanacions preventives, l'estudi portat a terme per Coll i els seus col·laboradors (2004),⁹⁷ mostrava que només un 7% entre 1000 dones espanyoles entrevistades després del part, havien pres suplementes d'àcid fòlic en el període correcte. Un 86% afirmaven no haver rebut informació alguna i un 56% no coneixien cap malformació congènita que es pogués prevenir.

5. Transport dels folats

La naturalesa polar dels folats impedeix el seu pas per difusió a través de la membrana plasmàtica. La conseqüència evolutiva d'assolir la correcta arribada de folats a la cèl·lula (síntesi de nucleòtids i precursors d'aminoàcids necessaris per la proliferació cel·lular), s'ha traduït en el desenvolupament de diferents sistemes de transport mediat a nivell de membrana plasmàtica.⁷ Aquests processos

fonamentalment impliquen un portador [sistema de transport mediat per un portador de folat reduït (*Reduced folate carrier*, RFC)]^{133,134} o un receptor [sistema de transport mediat per receptor de folat (RF)],^{6,7} els dos sistemes de transport principals. També és recent la identificació d'un tercer sistema de transport; el transportador de folat acoblat a protó (*Proton-coupled folate transport*, PCFT).¹³⁵

5.1. Sistema de transport per portador de folat reduït (RFC)

El sistema de RFC,^{7,133,134,136,137} està present de forma generalitzada en els diferents tipus cel·lulars i tissulars, ja que desenvolupa la funció fonamental de l'homeostasi de folat a la cèl·lula. Per tant, el sistema de RFC és el més important pels folats. Es tracta d'un sistema de transport a través d'una proteïna portadora integrada a la membrana plasmàtica.^{136,138} Aquest portador és de naturalesa mòbil i permet el flux bidireccional de molècules. Està poc establerta la mecànica implicada en aquest tipus de transport. La hipòtesi consisteix en què es produeix per un fenomen de transestimulació, a través del qual es produiria una transposició fisiològica del portador dins de la membrana plasmàtica. L'acció de l'extrusió d'anions i fosfats orgànics o sulfats intracel·lulars cap al medi extracel·lular provocaria un canvi d'orientació del portador, des del costat intern al costat extern de la membrana. Amb aquest canvi d'orientació, el portador quedaria disponible per la unió dels folats en forma aniònica (el 5-MTHF i l'àcid folínic a pH fisiològic són aniònics) extracel·lular i el posterior transport cap a l'interior de la cèl·lula.

Aquest sistema de transport té preferència per les formes de folats reduïdes (per exemple el DHF, el THF i el 5-MTHF) i pels seus anàlegs 4-aminofolat com el metotrexat. La seva afinitat per les diferents formes metilades de folat i anàlegs els converteixen en inhibidors competitiu entre ells. És un sistema saturable a baixes concentracions (1-5 μM) pels seus substrats. Presenta menys afinitat per l'àcid fòlic. El seu funcionament es veu influenciat per la temperatura i el pH [des de pH fisiològic en cèl·lules leucèmiques (pH \approx 7.4), a pH lleugerament àcid en cèl·lules de l'epiteli luminal de l'intestí prim^{139,140} i cèl·lules de carcinoma de pròstata¹⁴¹].

El gen codificant del RFC humà, es troba al cromosoma 21, a la regió 21q22.2-3,¹⁴²⁻¹⁴⁴ està constituït per 6 exons, dels quals l'exó 1 que conté la maquinaria del promotor no es codifica. El codó d'inici està a l'exó 2 i el de parada al 6. Procedent d'aquest gen, s'han identificat 5 transcrits que codifiquen pel mateix tipus de proteïna.¹⁴⁴⁻¹⁴⁸ Aquest és el resultat de l'*splicing* alternatiu de l'ARN^{149,150} a la regió 5' del gen on es localitza l'exó 1 no codificant. Aquesta regió presenta un alt contingut en CpG i conté llocs d'unió a factors de regulació transcripcional. El gen pel RFC conté dos promotors (promotor A i promotor B). La presència de dos promotors indica la potencial importància que suposa per la cèl·lula la transcripció d'aquest gen i en conseqüència l'expressió del RFC.^{133,136,137} El promotor B està implicat en l'expressió generalitzada del RFC a través d'una transcripció constitutiva. En canvi, el promotor A mostra una transcripció restrictiva, en teixits concrets. Per tant la presència i el grau d'expressió final de RFC en els diferents teixits és el resultat combinat de factors de regulació transcripcional comuns a tots els tipus cel·lulars i de factors específics de certs teixits.

5.2. Sistema de transport per receptor de folat (RF)

S'ha produït una evolució cronològica en la terminologia utilitzada en la literatura sobre les proteïnes implicades en el sistema de transport per RF. Se'l va anomenar primer aglutinant o factor unidor de folat (*folate binder*),^{151,152} després proteïna lligant de folat (*folate binding proteins*, FBP)^{6,153} distingint una forma soluble (sFBP) i una altra forma associada a la membrana plasmàtica (mFBP) i, finalment com RF (*folate receptor*).^{6,7,154}

Les primeres mostres estudiades van ser els fluids biològics, identificant-se sFBP en sèrum d'individus amb estat deficitari en folats,¹⁵⁵ a saliva,¹⁵⁶ semen¹⁵⁷ i orina.¹⁵⁸ També en llet humana,¹⁵⁹ bovina¹⁶⁰ i de cabra.¹⁶¹ Aquests sFBP es descriuen com formes lliures de folat (apo-FBP) o amb folat lligat.¹⁵¹

Al 1987, Lurs i els seus col·laboradors¹⁶² van descriure la composició d'aminoàcids de les mFBP de cèl·lules KB (línia cel·lular de carcinoma epidèrmic humà). Descriuen també la presència d'àcids grassos encarregats de l'ancoratge de la FBP a

la membrana plasmàtica. Dos anys després, a través d'una fosfolipasa C específica per la glucosilfosfatidilinositol (GPI), es va aconseguir alliberar mFBP de la membrana plasmàtica, recolzant la hipòtesi de què una seqüència senyal de la FBP seria la responsable de l'ancoratge a la membrana.¹⁶³ El mateix any es demostra la presència d'una GPI en les mFBP expressades per cèl·lules KB en cultiu.¹⁶⁴ La mFBP es podia alliberar de la membrana plasmàtica convertint-se en sFBP.^{163,165} La determinació de més d'un 99% d'homologia entre la sFBP i la mFBP¹⁶⁶ confirmava que les dues formes eren traduïdes a partir d'un mateix gen.¹⁶⁷

A la mFBP se la va començar a anomenar RF. Per aquesta raó, i per tal d'evitar confusions, a partir d'ara es farà referència com FBP a les formes solubles i com RF a les ancorades a la membrana plasmàtica.

El RF s'expressa àmpliament en diferents parts de l'organisme. En teixits normals, ha estat localitzat al plexe coroïdal,¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ a les cèl·lules acinars de la mama i de la glàndula salivar submandibular,¹⁶⁹ a l'epiteli dels túbuls proximals del ronyó,^{169,170} a placenta,^{169,171} a les cèl·lules de revestiment alveolar, epiteli bronquial i de revestiment de les glàndules bronquials del pulmó.^{169,170} Al pàncrees i a la glàndula tiroide la seva expressió és més focalitzada.¹⁶⁹ El percentatge d'expressió però difereix entre els diferents teixits, amb predominància al plexe coroïdal.¹⁷⁰ També s'ha descrit la presència de RF en diferents parts del tracte genital masculí, com al epiteli de l'epidídim i a les cèl·lules basals dels túbuls deferents^{169,172} i a les cèl·lules Leydig del testicle.¹⁶⁹ A la glàndula prostàtica es produeix la síntesi de RF¹⁵⁷ que s'ancoren a vesícules que són secretades al epidídim, on es produeix la maduració espermàtica i el seu emmagatzematge. En l'ejaculat, aquestes FBP s'adhereixen a la superfície dels espermatozous amb una funció bacteriostàtica al tracte genital femení.¹⁷² En aquest últim, estan extensament expressades a les cèl·lules de la granulosa de l'ovari prepuberal,¹⁶⁹ a l'epiteli germinal de l'ovari,¹⁷³ al cos luti durant l'embaràs,¹⁶⁹ al teixit epitelial de la trompa de Falopi,¹⁶⁹ a l'úter/endometri,^{169,173} i al cèrvix.¹⁷³

L'expressió diferencial del RF entre els diferents tipus cel·lulars i tisulars respon a la diferent demanda de folats pel seu creixement,¹⁷⁴ en funció de les seves necessitats en

folats. Els teixits que tenen un grau de renovació més elevat presenten majors requeriments. Aquests són els teixits epitelials. Aquest fet està recolzat per l'alta expressió de RF en línies cel·lulars humanes malignes: cèl·lules KB,^{162,167,170} cèl·lules Caco-2 (carcinoma de colon),¹⁷⁰ cèl·lules HeLa (carcinoma de coll d'úter)¹⁷³ i adenocarcinoma d'ovari¹⁷⁵ entre d'altres. El percentatge d'expressió en teixits normals i malignes és de l'ordre de més de 20 vegades superior en els segons.¹⁷⁰ Aquest fet, apunta al RF com una diana ideal en teràpies anticàncer.

El trànsit dels folats a través d'aquest sistema es produeix a través d'un procés endocític.^{176,177}

S'han descrit tres isoformes del RF: RF- α ,^{163,166,167} RF- β ,¹⁷⁸ i RF- γ .¹⁷⁹ L'estructura gènica codificant de les isoformes de RF es localitza al cromosoma 11q13.2-q13.5.¹⁸⁰ Hi ha algunes característiques gèniques bàsiques que les diferencien.^{revisat per 181} Tenen una relació de número d'exons/introns diferent: RF- α : 7/6; RF- β i RF- γ : 5/4. També en quant a la regió promotora: el RF- α conté dos promotors (P1 localitzat a l'exó 1 i P4 a l'exó 4),¹⁸² mentre que el RF- β i el RF- γ en tenen només un. Finalment, el gen codificant pel RF- α està regulat per la presència de promotors diferencials, *splicing* alternatiu i traducció diferencial de mRNA,¹⁸² mentre que els RF- β i RF- γ estan controlats bàsicament per mecanismes transcripcionals.

Les seqüències d'aminoàcids d'aquestes isoformes presenta diferents graus d'homologia entre elles. La isoforma RF- γ presenta un 71% d'homologia amb el RF- α i un 79% amb el RF- β .^{179,183} Les tres isoformes presenten llocs potencials de N-glicosilació (RF- α i RF- γ 3, RF- β 2), i les tres contenen 16 residus de cisteïna. L'extrem N-terminal de les tres isoformes presenta un alt percentatge de conservació en la seva seqüència d'aminoàcids, mentre que són divergents en quant a l'extrem C-terminal.¹⁷⁹ Els extrems C-terminal del RF- α i del RF- β presenten senyals per la unió de l'ancorador GPI (serina 243 i asparagina 230, respectivament). Aquests són aminoàcids polars sense càrrega, fet que els permet ancorar a la membrana plasmàtica. La composició d'aminoàcids que forma l'extrem C-terminal del RF- γ , es caracteritza per tenir poc caràcter hidrofòbic. Presenta 16 aminoàcids apolars

(respecte els 30 i 19 del C-terminal del RF- α i RF- β) interromputs per dos aminoàcids amb càrrega (asparagina amb càrrega negativa i arginina amb càrrega positiva, a les posicions 2 i 6 de l'extrem C-terminal, respectivament).^{179,184} Les característiques de l'extrem C-terminal del RF- γ no permeten un ancoratge eficient a la membrana plasmàtica a través de la GPI, fet que la defineix com isoforma secretada o soluble.¹⁸⁴

Ha estat descrita una isoforma derivada del RF- γ , el RF- γ' . És el resultat de la deleció de 2 bases (TA) a la regió codificant amb el resultat de l'aparició d'un codó de stop. La conseqüència, l'aparició d'una proteïna més curta.^{179,183}

El RF- α presenta una expressió més extensa respecte el RF- β i el RF- γ/γ' . El RF- α s'expressa preferentment en teixits epitelials tal com s'han exposat anteriorment. L'expressió del RF- β es restringeix a placenta i a cèl·lules hematopoètiques, on el nivell d'expressió és de baix a moderat.^{178,185} Els neutròfils madurs de sang perifèrica expressen en un nivell superior aquesta isoforma de RF.¹⁸⁶ I el RF- γ/γ' , en teixits no patològics de melsa, timus i moll d'òs.¹⁷⁹ Però el percentatge d'expressió és molt major en mostres tissulars malignes d'ovari, úter, melsa, timus i moll de l'òs, com en el medi de cultiu de diferents línies cel·lulars de tumoracions malignes.¹⁷⁹ L'especificitat d'expressió en teixits hematopoètics RF- γ/γ' , i la seva naturalesa secretora, el converteix en un biomarcador per certs tumors hematopoètics.^{179,183,184} Ha estat descrita la relació de les diferents isoformes de RF amb diferent tipus de càncer.^{revisat per 181}

Els tres tipus de isoformes presenten alta afinitat per l'àcid fòlic (rang nM) comparat amb les formes reduïdes (rang $\mu\text{mol/L}$) (àcid fòlic > 5-MTHF); al contrari que els RFC. Però existeixen algunes diferències entre les diferents isoformes. Mentre que el RF- α presenta igual d'alta afinitat per les formes amb diestereoisomeria fisiològica 6S (5-MTHF, àcid folínic) que per l'àcid fòlic, el RF- β ho fa per les formes 6R (10-formiltetrahidrofolat, 5,10-MTHF).^{6,154,181,187} Aquesta diferència d'afinitat per les formes de folat del RF- α i del RF- β , són degudes a la divergència d'aminoàcids de les posicions 49 (leucina per alanina), 104 (fenilalanina per valina) i 166 (glicina per

glutamat), respectivament.¹⁸⁸ La isoforma RF- γ/γ' , presenta alta afinitat pel (6S)-5-MTHF i per l'àcid fòlic.¹⁸⁴

També s'ha identificat el gen d'una quarta isoforma; el RF- δ .¹⁸⁹ Presenta un 67-69% de similitud i un 54-58% d'identitat amb el RF- α , RF- β i RF- γ . El gen per aquesta isoforma, es localitza a la banda cromosòmica 11q14, allunyada de la localització de les seqüències pels RF- α i RF- β . Aquest gen, codificaria una proteïna de 241 aminoàcids, amb un pes molecular de 27.7 kDa. No s'ha detectat la seva expressió en teixits embrionaris, fetals ni adults; fet que suscita que es pugui tractar d'un pseudogen de RF, tal com ja s'havia descrit anteriorment.¹⁹⁰ Spiegelstein i els seus col·laboradors,¹⁸⁹ suggereixen que la dificultat de detectar la seva expressió, estaria causat per l'efecte d'un patró de regulació espai/temporal molt restrictiu.

A part de la funció bàsica de transport intracel·lular dels folats, s'han plantejat altres funcions del RF. Per una banda té un paper conservador en aquelles zones on els requeriments en folats és essencial, com és el cas del plexe coroïdal o amb la funció d'evitar al màxim la seva pèrdua com és el cas dels RF localitzats als epitelis de conductes com els túbuls proximals del ronyó, del pàncrees, vas deferents i glàndula salivar. I per una altra banda assegurar els requeriments nutricionals en folats necessaris en certs teixits com a la placenta, endometri, diferents parts del tracte genital masculí i ejaculat, per assegurar l'èxit reproductiu.

5.3. Sistema de transport per transportador de folat acoblat a protó (PCFT)

Al 2005, s'identificava un transportador intestinal hemo regulat pel ferro (*heme carrier protein 1*; HCP1).¹⁹¹ La seva expressió a la membrana apical dels enteròcits del duodè de ratolí era incrementada sota condicions de deficiència de ferro. Els autors el definien com un transportador involucrat en el transport del ferro hemo (resultat del trencament de la hemoglobina i la mioglobina que conté la carn vermella). Un any després, s'identificava un transportador de folat acoblat a protó humà, el PCFT;¹³⁵ que va resultar ser el mateix transportador descrit un any abans. La baixa afinitat d'aquest transportador pel grup hemo ($K_m \approx 125 \mu M$) comparat amb la del folat ($K_m \approx 1.3$

μM),¹³⁵ suggeria que realment la seva funció estava implicada en el transport de folat.¹¹

Es tracta d'un sistema de transport amb alta afinitat i velocitat màxima de transport a pH àcid (pH 5.5-6-5),¹⁹² tot i que també presenta certa activitat residual a pH 7.4 pel 5-MTHF. El transport del folat està acoblat al transport a favor de gradient de protons.¹³⁵ Es va identificar el mARN del gen candidat que codificaria aquesta proteïna de membrana (gen 21) en un alt percentatge a l'intestí prim, en particular al duodè. I en menor grau a jejú, íleum, cec, colon i recte.^{135,191,193} També ha estat identificat a la membrana apical de l'epiteli renal.^{193,194} Totes aquestes característiques el defineixen com un transportador amb propietats característiques del transport intestinal, recolzant la idea de la seva implicació en l'absorció de folat intestinal.^{135,192,194,195}

El mecanisme implicat en l'absorció intestinal dels folats sempre ha suscitat molt interès, justificat pel fet que l'intestí constitueix el portal indispensable en l'absorció d'aquesta vitamina a través de la dieta. Fins fa poc temps aquesta funció s'atribuïa al RFC. Però la identificació del PCFT¹³⁵ a la membrana apical dels enteròcits¹⁹³ posava en dubte aquesta autoria, en base a les seves propietats d'activitat òptima a pH àcid¹¹ en cèl·lules intestinals i la seva alta presència al duodè. Però per contra, es demostrava que el sistema de RFC, tot i presentar una activitat òptima a pH fisiològic, modificava lleugerament la seva afinitat pels folats amb la reducció del pH.^{196,197}

La malabsorció de folat hereditària,^{198,199} és un desordre hereditari autosòmic recessiu rar, caracteritzat per la reducció de l'activitat d'absorció intestinal de folat. És un desordre hereditari, que es posa de manifest els primers mesos de vida. Requereix el tractament via parenteral o a través de la suplementació d'altres dosis d'àcid fòlic. Aquest tractament ha de iniciar-se el més aviat possible, degut a la fatalitat del dèficit en folats o al desenvolupament de deficiències neurològiques permanents. El dèficit d'absorció intestinal de folats i per tant a nivell sistèmic, es tradueix en una baixa disponibilitat d'aquesta vitamina pel sistema nerviós central. En aquest, els nivells de

folats estan per sota dels límits detectables, fins i tot quan els valors sèrics són normalitzats.

S'han descrit diferents mutacions puntuals en el gen codificant del PCFT.^{135,192,200,201} Entre les diferents mutacions del PCFT descrites associades a la malabsorció de folat hereditària, existeixen dues que permeten una activitat residual del transportador. Els individus portadors d'aquestes mutacions, veurien millorats els nivells sistèmics en folats a través de la suplementació oral d'altres dosis d'àcid fòlic.¹⁹² El PCFT desenvoluparia la funció principal d'absorció de folat intestinal²⁰² al tram superior de l'intestí prim, mentre que el RFC tot i que en condicions d'activitat subòptimes podria contribuir a una absorció menor en els trams de l'intestí amb un pH més àcid (duodè i jejúnum) i a un major grau d'absorció on el pH és més bàsic (íleum).^{192,203}

En pacients amb malabsorció de folat intestinal hereditària, la concentració de folats al líquid cerebroespinal és molt baixa. Tot i els tractaments amb altres dosis d'àcid fòlic, els valors en folat al sistema nerviós no augmenten de forma significativa. Aquest fet indicaria que el PCFT és necessari pel transport de folats al sistema nerviós central. També s'ha demostrat la importància del RF- α en el transport de folats al líquid cerebroespinal en la deficiència de folat cerebral (DFC).^{204,205} La identificació del PCFT en altres teixits amb un pH menys àcid, indicaria que el PCFT desenvoluparia una important funció en l'endocitosi mediada per RF.^{206,207} En aquest procés el PCFT situat a la membrana de les vesícules citoplasmàtiques, estaria implicat en la seva acidificació i així contribuint a l'alliberament del folat lligat al RF- α .²⁰⁸

6. Autoanticossos pels receptors de folat

Només un percentatge d'anomalies del desenvolupament embrionari són explicades pels factors nutricionals, genètics i patològics identificats com a causants del dèficit en folats i, les mesures preventives adoptades no han ofert la profilaxi total esperada. Recentment han estat descrits els autoanticossos pels RF.²⁰⁹

Da Costa i els seus col·laboradors al 2003,²¹⁰ varen demostrar immunohistoquímicament en rates femelles l'àmplia expressió de RF en els diferents teixits reproductius, tant en rates prenyades com no prenyades. També es produeix un alt percentatge d'expressió de RF en diversos teixits embrionaris en diferents estadis del desenvolupament. L'extensa expressió d'aquests RF indicava la funció d'un paper imprescindible d'aquests durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari. A partir de la injecció de 0.25 mL d'antisèrum, obtingut de conills als quals s'havia injectat RF purificats a partir de placenta de rata, varen observar efectes greus sobre els embrions. La gravetat de l'efecte i la velocitat d'afectació era proporcional al volum d'antisèrum injectat. La supervivència d'embrions es reduïa en el temps (dies de gestació) i augmentava el número de defectes del desenvolupament, amb l'augment de volum d'antisèrum administrat. L'àcid folínic (12 mg per kg de pes), administrat conjuntament amb 0.3 mL d'antisèrum prevenia el 95% de les absorcions embrionàries que es produïen quan l'antisèrum era administrat sense àcid folínic. A volums superiors d'antisèrum, la mateixa quantitat d'àcid folínic, perdia el seu potencial preventiu. En rates tractades amb una dosi de dexametasona (actiu antiinflamatori i immunosupressor esteroideu) el dia abans i el dia després de l'administració de 0.4 mL d'antisèrum, el percentatge de prevenció d'absorcions embrionàries era d'un 97%. Per contra, quan s'administraven les dues dosis després de l'administració de l'antisèrum, l'efecte letal de l'antisèrum no es prevenia. Segons els autors, probablement les absorcions embrionàries eren degudes a una reacció citolítica immunològica, i no al dèficit en folats. També suggerien que un antisèrum específic que bloquegi la unió dels folats als RF abans de la fecundació, podria afectar de forma directa el procés d'ovulació, la fertilitat, i la implantació. L'efecte d'aquests a estadis més evolucionats, impediria el correcte transport de folats de mare a fetus, veient-se afectats els processos d'embriogènesi i organogènesi, amb greus conseqüències en el resultat final del procés.

Posteriorment va ser publicada la detecció d'autoanticossos capaços de bloquejar el lloc d'unió específic dels folats dels RF en el sèrum humà.²⁰⁹ L'efecte d'aquest bloqueig és la incapacitat del RF per poder transportar els folats, i per tant, perjudicar l'estat en folats al lloc de destí d'aquesta vitamina. Els definien com autoanticossos

contra RF. Una alteració a aquest nivell, impediria el correcte transport de folats i podria desencadenar anomalies que tenen una etiologia relacionada amb l'estat en folats. Una d'aquestes complicacions, són els DTN tal com s'ha exposat anteriorment. A l'analitzar el sèrum de 12 mares amb un embaràs en curs o previ al moment de l'estudi afectat i 20 dones controls amb gestació en curs o prèvia no afectada, van observar que un percentatge significativament més alt dels casos (75%) eren portadores d'aquests autoanticossos respecte els controls (10%). Descriuen així un nou factor de risc pels DTN fins el moment desconegut. La descripció d'aquests autoanticossos entre aquest sector de la població, podria explicar el benefici observat després de les mesures preventives adoptades a nivell estatal de fortificació a EEUU,³¹ proporcionant l'evidència que l'àcid fòlic evadiria la ruta cel·lular depenent del RF, a favor del RFC, gràcies a la naturalesa oxidada de l'àcid fòlic. Per altra banda, l'increment en la concentració de formes de folat provinents de l'àcid fòlic metabolitzat, desplaçaria l'autoanticòs blocant que presenta una menor afinitat pel RF. El grup especulava que "epítops de RF exposats com a resultat de lesió o proteòlisi de teixits reproductius, junt amb factors genètics podrien desencadenar la generació d'autoanticossos".

Blik i els seus col·laboradors (2006),²¹¹ van descriure la presència d'autoanticossos materns contra RF en un 82% de mares de nens amb fenedura labial i/o palatina (FLP), i en un 30% de mares control amb nens sense la patologia. Entre el grup de casos i controls, no hi havia diferències significatives en les concentracions de folat plasmàtic ni eritrocitari. Però sí valors significativament més elevats de tHcy en el grup de mares amb nens amb FLP. Les mares portadores d'autoanticossos presentaven concentracions més elevades de tHcy, i nivells de folats plasmàtics significativament més baixos respecte les mares sense autoanticossos. No hi havia diferències en les concentracions de folats eritrocitaris.

Al 2007, Neuman i els seus col·laboradors²¹² van presentar al *27th Annual Meeting of the Society for Maternal Fetal Medicina*, els resultats sobre la presència d'autoanticossos contra RF, en un 13.7% de les dones estudiades amb historial recurrent d'avortaments espontanis (AE), respecte el grup control (5%), amb un risc de

gairebé el triple de patir AE amb presència d'aquests autoanticossos. Tot i la presència d'autoanticossos en mares de nens amb defectes congènits del cor (9%) i en els controls amb les que es van comparar (8%), aquestes diferències no eren significatives. No es van detectar diferències en les concentracions de folats eritrocitaris ni de tHcy al comparar casos i controls per les dues patologies.

S'ha investigat la possible associació entre autoanticossos contra RF i desordres del desenvolupament neuronal progressiu, com el síndrome de Rett, el DFC idiopàtic, i l'autisme. El síndrome de Rett, és un desordre del neurodesenvolupament postnatal progressiu que afecta de forma gairebé majoritària el sexe femení i amb una base genètica ben descrita,²¹³ en què aproximadament un 50% dels casos presenten concentracions baixes de 5-MTHF al líquid cerebroespinal.²¹⁴ Ramaekers i els seus col·laboradors (2007),²¹⁵ descriuen la presència d'autoanticossos contra RF en 8 de les 33 (24%) pacients europees estudiades [8 del nord-oest d'Europa (6 d'Alemanya, 2 de Bèlgica), 25 del sud d'Europa (11 d'Espanya i 14 de Portugal)]. Cap de les 28 controls europees presentava autoanticossos contra RF. Entre les participants del nord i del sud d'Europa no hi havia diferències en la concentració de folats plasmàtics. Els 70 casos d'Amèrica del nord presentaven concentracions de folat plasmàtic significativament més elevades que els 33 casos i els 28 controls europeus. Aquest fet era justificat per la fortificació obligatòria amb àcid fòlic implementada a Nord-Amèrica. Referent a la concentració de 5-MTHF al líquid cerebroespinal, els casos del nord d'Europa tenien concentracions més baixes respecte els del sud d'Europa. El total de casos europeus, presentaven concentracions de 5-MTHF al líquid cerebroespinal significativament inferiors que els casos d'Amèrica del Nord i els controls europeus. El 42% dels casos europeus tenien valors de 5-MTHF al líquid cerebroespinal per sota del rang normal, suggerint que el transport de folats a través del plexe coroïdal podria estar blocat per autoanticossos contra RF. Per contra entre els casos europeus que tenien concentracions de 5-MTHF dins els límits de referència, només un 10% tenien autoanticossos contra RF. Els casos de síndrome de Rett del nord-oest d'Europa, presentaven concentracions de 5-MTHF al líquid cerebroespinal més baixes junt amb major percentatge de casos amb autoanticossos contra RF. Els autors apuntaven que aquestes diferències de presència

d'autoanticossos contra RF entre els països del nord i del sud d'Europa, podrien ser degudes al diferent índex de consum de llet i derivats d'aquesta. La llet bovina és rica en FBP. Aquesta proteïna, i el RF- α d'origen humà comparteixen més d'un 80% d'homologia en la seva seqüència proteica, segons el *Protein Alignment Search Tool* (blastp).²¹⁶ El RF d'origen boví era presentat com el possible generador d'autoimmunitat en humans.

Una altra alteració del desenvolupament neuronal estudiada és el síndrome de DFC. Apareix entre els quatre i els sis mesos de vida, i es caracteritza per un dèficit de 5-MTHF al líquid cerebroespinal, mentre que a nivell sistèmic l'estat en folats és l'adequat.²¹⁷ L'estudi de 28 pacients amb síndrome de DFC idiopàtic, va revelar que 25 (89%) eren portadors d'autoanticossos contra RF.²⁰⁴ Era nul·la la seva presència entre els 41 controls aparellats per l'edat amb els casos i també hi havia absència d'aquests entre les 5 mares dels casos estudiats. No hi havien diferències significatives en la concentració de folat plasmàtic entre casos i controls. Es va mesurar la concentració de 5-MTHF al líquid cerebroespinal al mes, als tres i sis mesos d'iniciar el tractament dels casos de DFC amb una dosi d'entre 0.5 i 1 mg per kg de pes corporal d'àcid folínic repartida en dues preses al dia. La concentració de 5-MTHF al final del tractament, havia millorat significativament respecte l'inici [mitjana pre-tractament: 20.06 nmol/L (rang: 0-46.3); mitjana post-tractament: 73.3 nmol/L (rang: 45.4-120.7); mitjana dels valors de normalitat de referència utilitzats: 82 nmol/L (rang: 44-181)], sense diferències significatives entre casos i controls al finalitzar. Les principals manifestacions clíniques del síndrome van millorar. Al final del tractament les millores més remarcables va ser entre els pacients en què el diagnòstic del síndrome va ser precoç, i per tant el sistema nerviós central no havia estat tan afectat pel dèficit en folats. Els resultats demostraven que la presència d'autoanticossos contra RF bloquejant els RF localitzats a les cèl·lules epitelials del plexe coroïdal, podrien ser la conseqüència de la fallida del transport de folats cap al líquid cerebroespinal en els casos de DFC idiopàtic, i que l'administració d'àcid folínic millorava les manifestacions més comuns del quadre clínic del síndrome. Segons l'opinió dels autors, la producció d'aquests autoanticossos s'iniciaria en el mateix moment en què apareixen les primeres manifestacions clíniques del síndrome.

Descrita l'associació entre la presència d'autoanticossos contra RF amb el síndrome de desenvolupament neuronal DFC, s'ha buscat l'existència d'aquests autoanticossos en nens amb autisme amb o sense deficiències neuronals.²¹⁸ La mostra d'estudi es tractava de 25 pacients amb autisme dins la categoria de síndrome de Kanner²¹⁹ i amb DFC. Tots mostraven concentracions de folat plasmàtic i eritrocitari, Cbl i tHcy dins els valors normals, sense diferències significatives respecte el grup control. Del total de casos a estudiar, només dos casos tenien concentracions de 5-MTHF al líquid cerebroespinal baixes tot i que dins el límit inferior i, no eren portadors d'autoanticossos contra RF. Entre la resta es van detectar autoanticossos contra RF en 19 casos [mitjana 1.05 pmol RF blocat/mL de sèrum (rang: 0.1-4.19)]. Cap dels individus presentaven mutacions genètiques que comprometessin el transport dels folats. Del total de casos, 21 van ser tractats amb 1 mg d'àcid folínic per kg de pes al dia. Als 3-6 mesos d'haver iniciat el tractament es va determinar la concentració de 5-MTHF al líquid cerebroespinal, per tal de detectar els casos que requerien una major dosi (2-3 mg per kg de pes al dia) per tal de normalitzar la concentració d'aquest al líquid cerebroespinal. L'avaluació dels resultats del tractament, es va realitzar en 18 casos. Tots van veure normalitzats la concentració de 5-MTHF al líquid cerebroespinal. Els dos individus que se'ls va diagnosticar l'autisme més aviat (entre els 2 i els 3 anys d'edat) es van recuperar totalment de l'autisme i dels dèficits neurològics. Només es va observar recuperació neuronal entre els 5 casos diagnosticats a edat més avançada (5, 8 i 12 anys d'edat), però sense recuperació del quadre clínic de l'autisme. La resta, van aconseguir una millora en les deficiències neurològiques i una recuperació parcial de l'autisme. Tal i com ja s'havia demostrat anteriorment,²⁰⁴ el tractament amb àcid folínic millorava les manifestacions clíniques derivades de la DFC amb presència d'autoanticossos contra RF. No obstant, la millora parcial de la majoria de casos d'aquest estudi, amb edats de diagnòstic de l'autisme mitjanes, deixava encara per esclarir la funció dels autoanticossos contra RF i la DFC en l'autisme amb defectes neurològics respecte els que no presenten defectes neurològics.

En un estudi de 24 pacients amb DFC, tractats amb àcid folínic per tal d'augmentar els nivells de 5-MTHF al líquid cerebroespinal (0.5-1 mg/kg al dia repartida en dues

dosis iguals, que depenent de la resposta obtinguda a la quantitat administrada, era ajustada a 0.4-2.5 mg/kg al dia), s'observava millora en les manifestacions del quadre clínic.²⁰⁵ Tots ells presentaven un bon estat en folats plasmàtics i eritrocitaris, en Cbl i tHcy. Tots eren portadors d'autoanticossos contra RF [mitjana 1.17 [desviació estàndard (DE): 0.83] pmol RF blocat/mL de sèrum; rang 0.19-3.47]. Tot i les millores clíniques observades, la titulació d'autoanticossos contra RF no disminuïa. L'estudi d'intervenció (FIGURA 4) va consistir en mantenir 12 participants (grup no intervenció) amb una dieta normal, mentre que la resta (grup intervenció) es van comprometre a eliminar de la seva dieta la llet i tots els derivats o productes que la contenen, sota el consell d'un dietista. La mitjana de titulació abans d'iniciar la dieta sense llet en el grup intervingut era de 2.08 pmol RF blocat/mL de sèrum assajat (DE: 2.11; rang 0.24-8.35). La mesura d'autoanticossos contra RF durant la dieta revelava que la titulació havia disminuït de forma significativa a una mitjana de 0.35 pmol RF blocat/mL de sèrum assajat (DE: 0.48; rang 0-1.32). En un 58.3% dels participants la concentració d'autoanticossos contra RF va disminuir tant que no va ser possible detectar-la mitjançant la tècnica utilitzada. Nou dels participants, després de 6 mesos amb una dieta lliure de llet, van restablir la seva dieta normal (grup restabliment). A les 6-14 setmanes es va observar que la titulació mitjana d'autoanticossos gairebé triplicava a la titulació mitjana observada abans d'iniciar la intervenció dietètica. Els altres 12 participants se'ls va mantenir amb una dieta normal, les titulacions d'autoanticossos van anar augmentant, quasi 4 vegades la concentració inicial (de 10 a 24 mesos de distància entre les dues mesures).

Els autors atribueixen la millora del quadre clínic del síndrome entre els participants que van seguir la dieta sense llet, a la combinació del tractament amb àcid folínic i la retirada de la dieta de llet i productes derivats.

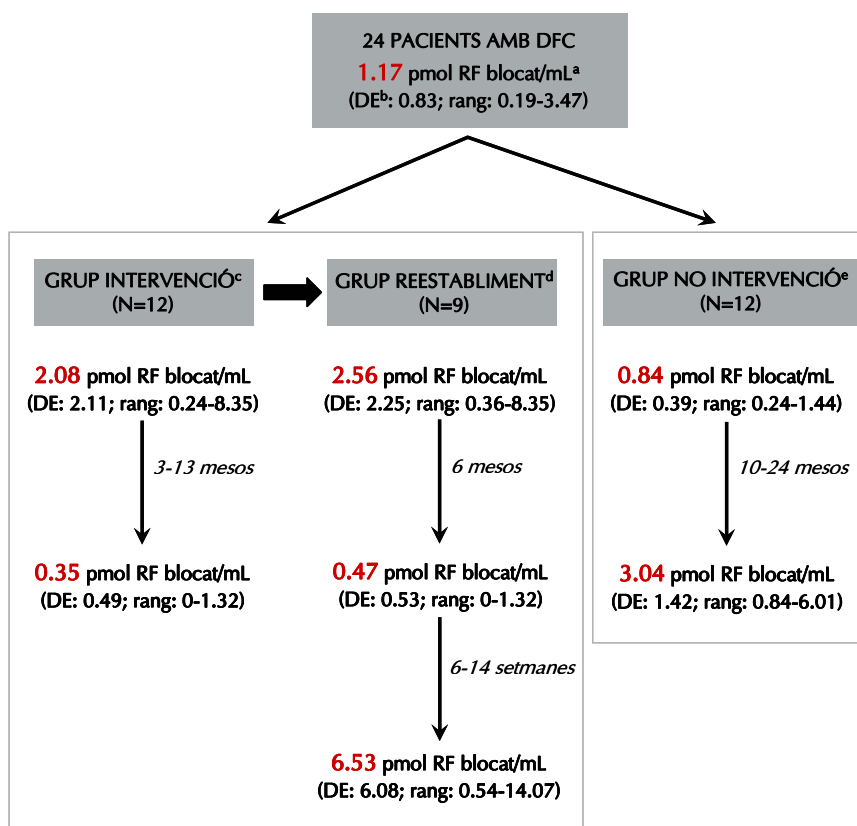


FIGURA 7. Resum de les titulacions mitjanes obtingudes en l'estudi d'intervenció de Ramaekers i els seus col·laboradors (2008)²⁰⁵

(a: mitjana titulació d'autoanticossos contra receptors de folat (RF) dels 24 pacients amb deficiència de folat cerebral (DFC), b: desviació estàndard de la titulació d'autoanticossos contra RF, c: 12 dels casos, formaven el grup de intervenció, que va consistir en retirar la llet derivats de la dieta, d: dels 12 casos que van seguir la intervenció dietètica, 9 a més a més, després van tornar a una dieta normal, e: 12 casos que no van seguir cap control dietètic).

Aquest mateix treball publicava els resultats quantitius de la reactivitat creuada entre els autoanticossos contra RF i els RF purificats de placenta humana, llet humana, llet bovina i llet de cabra. La major reactivitat es produïa amb els RF purificats de la llet bovina, seguida de la llet humana, de la llet de cabra i finalment de la placenta humana. Els autors justificaven la baixa reactivitat amb RF d'origen placentari, per l'expressió mixta de RF- α i RF- β en aquest teixit. En les mostres

sanguínies d'aquests nens i adolescents no s'esperaria trobar reactivitat amb el RF- β , sobretot si la llet estimula la producció d'aquests autoanticossos. Els RF utilitzats en la tècnica de detecció d'autoanticossos contra RF provenen de la llet bovina, que de forma exclusiva conté RF- α . Tot i l'homologia entre les dues isoformes^{179,183} l'ús de RF- α condiona la detecció més extensa d'autoanticossos contra RF- α que RF- β .

Els autors afirmaven que en presència de característiques clíniques associades amb el risc de patir DFC o síndrome de Rett, junt amb la presència d'autoanticossos contra RF, la combinació del tractament amb altes dosis d'àcid folínic i la disminució de la titulació d'autoanticossos contra RF seria beneficiós en aquests síndromes.

Una recent publicació²²⁰ ha comparat la presència d'autoanticossos tant per RF d'origen placentari com de llet bovina en mostres sèriques de dones amb una gestació en curs afectada per DTN (29 casos) respecte dones amb un embaràs sense complicacions (76 controls). La mostra de sang va ser recollida entre les 15-18 setmanes de gestació. De la mateixa manera com es va descriure prèviament,²⁰⁹ citaven la presència d'aquests autoanticossos com un factor de risc per DTN. Però els dos estudis diferien en el moment de recollida de la mostra sanguínia. Tres de les 20 dones voluntàries del treball del 2004 estaven embarassades al moment de la recollida de la mostra sanguínia comparat amb la totalitat (105) de les participants del treball del 2008. Amb l'objectiu de discernir entre el RF d'origen placentari i el de llet bovina com a responsable de la generació d'aquests autoanticossos, Cabrera i els seus col·laboradors²²⁰ comparaven la concentració mitjana de titulació d'autoanticossos contra RF purificats a partir de dues placentes, RF purificats a partir de llet bovina i RF comercialitzats de llet bovina. La tècnica que descrivien els autors, permetia diferenciar autoanticossos IgG i IgM. Tant per anti-IgG com anti-IgM, per totes les proteïnes transportadores estudiades (RF de placentes i RF de llet bovina), les concentracions mitjanes de titulacions d'autoanticossos eren significativament més elevades entre els casos que en els controls. Van calcular el risc de DTN en presència d'autoanticossos tipus IgG i IgM contra RF de placenta [odds ratio (OR): 2.15 i 3.19, respectivament] i IgM contra RF purificats de llet bovina (OR: 2.07).

Ha estat citada com a possible mecanisme desencadenant de la generació d'aquests autoanticossos, una concentració en excés de tHcy, amb la conseqüent formació de homocisteïna-tiolactona (HTL).²²¹ Aquesta possible via, serà discutida més endavant.

A part de l'evidència de la presència d'autoanticossos pels RF en complicacions del desenvolupament neurològic del fetus i en nens, s'ha relacionat amb el càncer. S'ha descrit la relació de la resposta immunològica pel RF- α en relació al càncer.²²² Es van comparar 20 pacients amb càncer d'ovari o de mama amb 18 pacients sanes. A partir de 14 pèptids del RF- α predits, es va mesurar la immunitat preexistent entre les participants. Les pacients amb càncer presentaven immunitat a una mitjana de tres epítops del RF- α , respecte els controls que només ho feien per un epítop. El 69% i 76% de les pacients amb càncer d'ovari i de mama respectivament, presentaven immunitat per almenys un epítop del RF- α . Es demostrava una tolerància immunològica mínima pel RF- α entre dones amb càncer d'ovari o mama.

Queden encara moltes qüestions a resoldre sobre els autoanticossos contra RF. Una d'elles, el desenvolupament de la metodologia utilitzada en la detecció d'autoanticossos dels RF (**CAPÍTOL 1**). La **TAULA 1** recull un resum dels coneixements en el camp dels autoanticossos pels RF, els sectors abordats en aquesta tesi i els que encara queden per resoldre. Fins la data, la investigació sobre autoanticossos pels RF s'ha centrat en complicacions de l'embaràs, en desordres neuronals d'aparició primerenca i càncer. No s'ha estudiat la presència d'aquests autoanticossos contra RF en la població general ni les possibles implicacions en els requeriments de folats i per la salut pública. Aquesta qüestió és tractada en el **CAPÍTOL 2**. També aquesta tesi aborda la qüestió de si la seva presència abans de la concepció o als primers estadis de desenvolupament embrionari, poden tenir un efecte sobre la fertilitat en dones (**CAPÍTOL 3**). Finalment, si la presència d'autoanticossos contra RF durant l'embaràs afecta l'estat en folats matern i del fetus i si influeix sobre el resultat de l'embaràs. (**CAPÍTOL 4**). Aquests són els aspectes generals que es tracten en aquesta tesi, però d'altres de més particulars són exposats a cadascun dels capítols.

TAULA 1. Revisió bibliogràfica sobre autoanticossos contra els receptors de folat, la contribució d'aquesta tesi i investigació futura.

	Conegut <small>Referència bibliogràfica</small>	Desconegut	Contribució Tesi	Investigació futura
RATES	Expressió de RF en teixits reproductius, en rates prenyades i no prenyades. Efecte d'antisèrum contra RF, en anomalies del desenvolupament embrionari. ²¹⁰	Efectes d'aquest antisèrum en rates no prenyades, i en teixit reproductiu masculí? Efecte sobre el desenvolupament neuronal	-	Funció del folat en el desenvolupament, la funció i conducta cerebral, utilitzant autoanticossos contra RF durant el desenvolupament embrionari i fetal BECA BEATRIU PINÓS, AGAUR (RESOLUCIÓ ABRIL, 2009)
HUMANS	EMBRIÓ-FETUS	Presència en embrions/fetus	-	-
	CORDÓ	Presència en cordó	CAPÍTOL 3	
	INFANT Presència d'autoanticossos en nenes amb síndrome de Rett, ²¹⁵ nens amb autisme i DFC, ²¹⁸ nens i nenes amb DFC. ^{204,205}	Presència en nenes i nens sans Implicacions pels requeriments de folats	-	-
	ADOLESCENT Adolescents amb DFC ^{204,205} i amb síndrome de Rett. ²¹⁵	Presència en adolescents sans	-	-
	ADULT Presència autoanticossos en dones amb historial d'AE recurrents, ²¹² presència en dones amb embaràs actual i previ afectat amb DTN, ^{209,220} presència en mares NO embarassades amb nen/a amb FLP o afectat per DCC. ²¹¹ Resposta immunològica pel RF- α en dones amb càncer d'ovari i mama. ²²²	(a) Presència en població general sana de 18-75 anys (b) Causa de la seva producció (c) Presència a la periconcepció i relació amb la subfertilitat i (d) l'AE (e) Conseqüència de la seva presència durant l'embaràs per l'estat en folats de la mare i del cordó i (f) l'evolució de l'embaràs.	CAPÍTOL 2 (a, b) CAPÍTOL 3 (c, d) CAPÍTOL 4 (e, f)	-

AE: avortament espontani, DCC: defectes congènits del cor, DFC: deficiència de folat cerebral, DTN: defectes del tub neural, FLP: fenedura labial i/o palatina, RF: receptor de folat



HIPÒTESI I OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

HIPÒTESI I OBJECTIUS

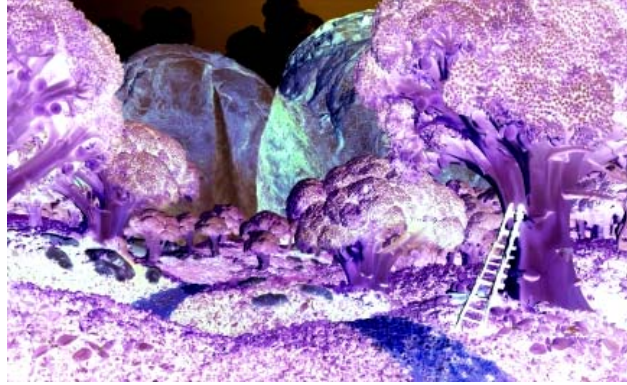
La **hipòtesi de treball** és que el bloqueig del lloc específic del receptor de folat on es lliga el folat per autoanticossos podria perjudicar l'estat en folats. La conseqüència d'impedir aquesta via de transport de folats serà diferent segons la funció fisiològica afectada.

L'**objectiu general** d'aquest treball és determinar l'efecte de la presència d'autoanticossos contra RF sobre l'estat en folats de la població general, de la mare durant l'embaràs i del cordó i, l'associació amb la subfertilitat en dones i pes al néixer.

Els **objectius específics** proposats són:

- Descripció i crítica detallada de la posada a punt de les tècniques de detecció d'autoanticossos de RF (*blocking* i *binding*) i creació de protocols de laboratori.
- Determinar la prevalença d'autoanticossos contra RF en una mostra representativa seleccionada a l'atzar d'una població espanyola.
- Investigar l'associació entre la presència d'autoanticossos contra RF i l'estat nutricional en folats a la població.
- Investigar l'associació entre el consum habitual de llet i la presència d'autoanticossos contra RF.
- Determinar la presència d'autoanticossos contra RF de forma longitudinal a la fase preconcepcional en dones planificant un embaràs.
- Investigar l'associació entre la presència d'autoanticossos contra RF i la subfertilitat en dones.
- Investigar l'associació entre la presència d'autoanticossos contra RF durant el primer trimestre d'embaràs i l'avortament espontani d'embrió viable diagnosticat ecogràficament.

- Investigar l'efecte de la presència d'autoanticossos contra RF en qualsevol moment de l'embaràs sobre l'estat en folats de la mare i la presència d'autoanticossos contra RF al cordó sobre l'estat en folats al cordó.
- Investigar la conseqüència de la presència d'autoanticossos contra RF en qualsevol moment de l'embaràs i al cordó, sobre el pes de naixement.



MATERIAL I METODOLOGIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

MATERIAL I METODOLOGIA

1. MATERIAL

1.1. Subjectes

Totes les mostres biològiques utilitzades provenen de col·leccions d'estudis diferents i independents en el temps. Aquests estudis són Estudi Poblacional, Estudi PreC i Estudi NUTCIR.

Estudi Poblacional

Estudi transversal portat a terme entre 1998 i 2002 a la Unitat de Medicina Preventiva i Salut Pública (MPSP) de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut (FMCS) de la Universitat Rovira i Virgili (URV), en col·laboració amb els centres mèdics dels municipis on es van reclutar els voluntaris; investigador principal Dr. Joan Fernandez-Ballart. Es van reclutar individus per tal de conformar una mostra representativa d'una població mediterrània espanyola, estratificada per edat (entre 18 i 75 anys) i sexe. A la **FIGURA 8**, hi ha representat el disseny de reclutament de participants. Els voluntaris provenien de 3 municipis de la província de Tarragona. Els candidats es van seleccionar mitjançant un mostreig aleatori simple a partir dels registres dels padrons de 1996 de l'ajuntament dels tres municipis. L'equip investigador va seleccionar a l'atzar 1563 individus als quals se'ls va enviar una carta informativa sobre l'estudi. Posteriorment l'equip investigador es va posar en contacte amb ells telefònicament per tal de convidar-los a participar a l'estudi. L'aplicació dels criteris d'exclusió i incorporació de participants a l'estudi estan resumits a la **FIGURA 8**. Un total de 812 voluntaris van participar (66% de la població elegible a participar).

A tots els participants se'ls va fer un reconeixement mèdic, es van registrar pes i alçada entre d'altres mesures antropomètriques i se'ls va entrevistar sobre els hàbits i estil de vida.

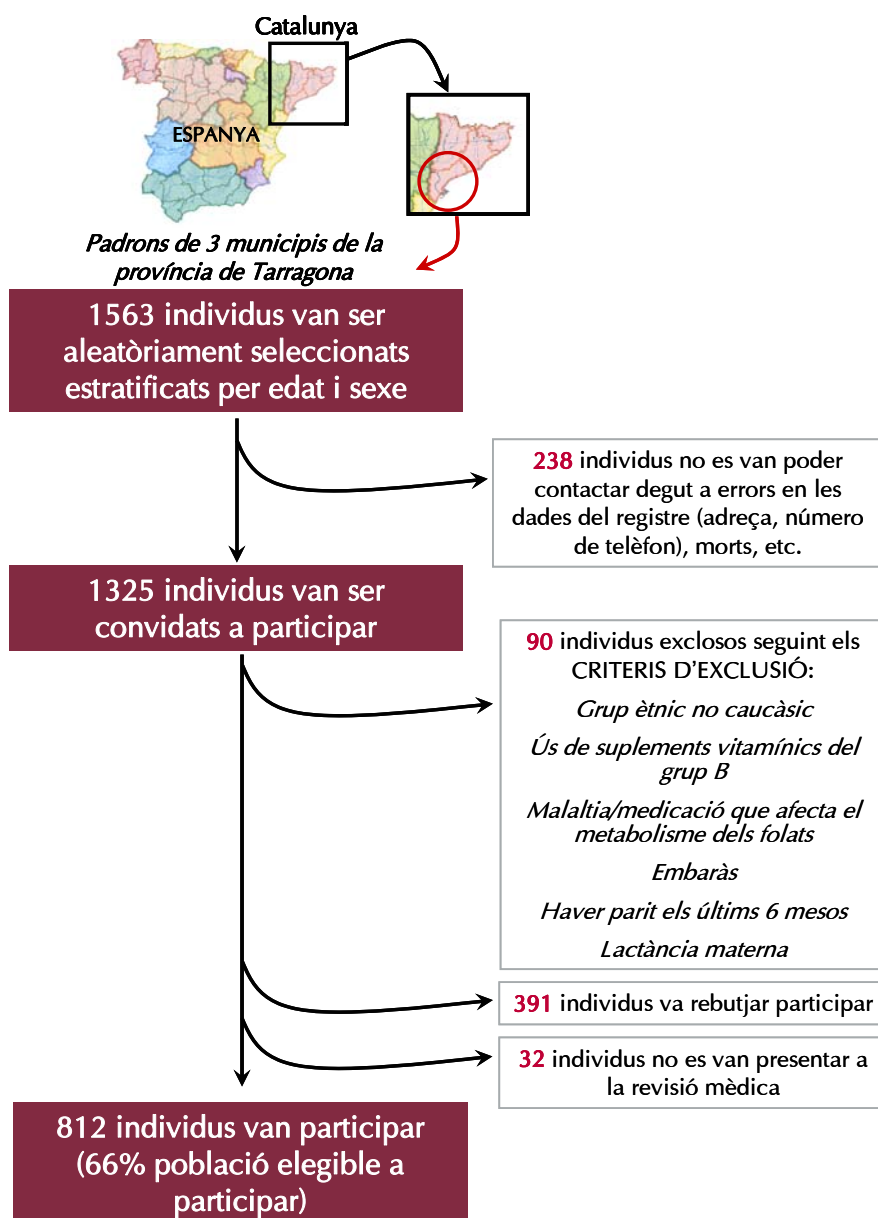


FIGURA 8. Disseny de reclutament de voluntaris de l'Estudi Poblacional.

Els voluntaris van registrar el consum alimentari de tres dies; corresponent a dos dies laborals no consecutius i un dia de cap de setmana. Posteriorment, van ser entrevistats per un dietista mitjançant imatges fotogràfiques de mesures casolanes, per tal d'estimar la quantitat consumida. Per punció antecubital se'ls va extreure 10 mL de sang amb àcid etilendiamintetraacètic tripotàsic (EDTA-K₃) i 10 mL de sang amb heparina-liti. Les mostres van ser mantingudes a 4°C fins l'inici del seu processament dins un interval màxim de 2 hores després de la seva extracció.

Estudi PreC

PreC és l'acrònim de "PRE Concepció". Estudi longitudinal portat a terme entre 1991 i 1996 a la Unitat de MPSP de la FMCS de la URV en col·laboració amb la Unitat d'Obstetrícia i Ginecologia de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus (HUSJR); investigador principal Dr. Joan Fernández-Ballart. Aquest estudi formava part d'un estudi sobre l'evolució de l'estat nutricional de la dona durant les etapes periconcepcional i de l'embaràs. El reclutament de voluntàries es va portar a terme a través de la difusió dels mitjans de comunicació locals tant escrits com audiovisuals i, amb butlletes informatives als centres d'atenció primària de la ciutat de Reus. Es convidava a participar a l'estudi, a totes aquelles dones que estaven planificant de quedar-se embarassades. Aquestes acceptaven entrar a participar a l'estudi a la preconcepció i en el cas de quedar-se embarassades la seva participació es perllongava fins al final de l'embaràs. Els criteris d'inclusió utilitzats van ser: tenir entre 18 i 35 anys, estar sanes, i no estar embarassades. Els d'exclusió van ser el diagnòstic previ d'algun problema d'infertilitat, seguir algun tipus de tractament de fertilitat, patir alguna malaltia crònica que afectés l'estat nutricional de la dona o que requerís algun tipus de intervenció dietètica o nutricional, fracàs en l'embaràs després de 18 cicles menstruals i l'esterilitat. De les 159 dones reclutades, 10 es van excloure perquè ja estaven embarassades a la seva primera visita amb l'equip de l'estudi. Van abandonar l'estudi 32 després de quedar-se embarassades. Tot i que la finalitat última d'aquest estudi va ser valorar longitudinalment l'estat nutricional a la preconcepció i al llarg de l'embaràs,²²³⁻²²⁵ 17 participants no van aconseguir mai quedar-se embarassades i 6 van patir un AE.

El disseny de l'estudi (FIGURA 9) consistia en la obtenció de 5 mostres sanguínies maternes i una del cordó. Un dels punts claus va consistir en aconseguir la màxima uniformitat del moment de recollida de les mostres sanguínies. Per aquesta raó, el disseny de l'estudi va procurar que la comunicació entre la participant i l'equip investigador fos el més fluida possible. D'aquesta manera l'equip va disposar d'un telèfon amb contestador automàtic. Amb aquest objectiu l'equip controlava les trucades rebudes i els missatges registrats. Es va demanar a les participants que el primer dia del cicle menstrual, truquessin a aquest telèfon i se les citava entre els dies 7 i 12 del cicle menstrual per realitzar la primera extracció sanguínia (Mostra Preconcepcional). En el cas que la dona no es quedés embarassada en els següents tres cicles menstruals, es repetia el procés, posant-se en contacte amb l'equip investigador de nou i programant una nova extracció preconcepcional. Però en el cas que la dona tingués la primera falta de la menstruació, se li demanava que es fes una prova d'embaràs. En cas de donar positiva, es concertava visita a la sisena setmana d'embaràs, per tal de confirmar l'embaràs mitjançant ecografia. En cas de confirmació ecogràfica d'embaràs, es programaven extraccions sanguínies a la vuitena setmana de gestació (Mostra Primer Trimestre), a la vintena (Mostra Segon Trimestre) i a la trenta-dosena (Mostra Tercer Trimestre). També es recollia una cinquena mostra sanguínia durant el treball de part, (Mostra Treball de Part), i finalment una mostra de sang de la vena del cordó umbilical una vegada havia nascut la criatura i deslliurada la placenta (Mostra Cordó).

Cadascuna de les mostres sanguínies maternes, van realitzar-se en dejú (a excepció de la del treball de part), per punció antecubital. Es van recollir 10 mL de sang amb EDTA-K₃ i 10 mL de sang sense anticoagulant (tub sec). El mateix volum per les mostres de cordó. Totes les mostres processades, van ser al·liquotades i conservades a -20°C.

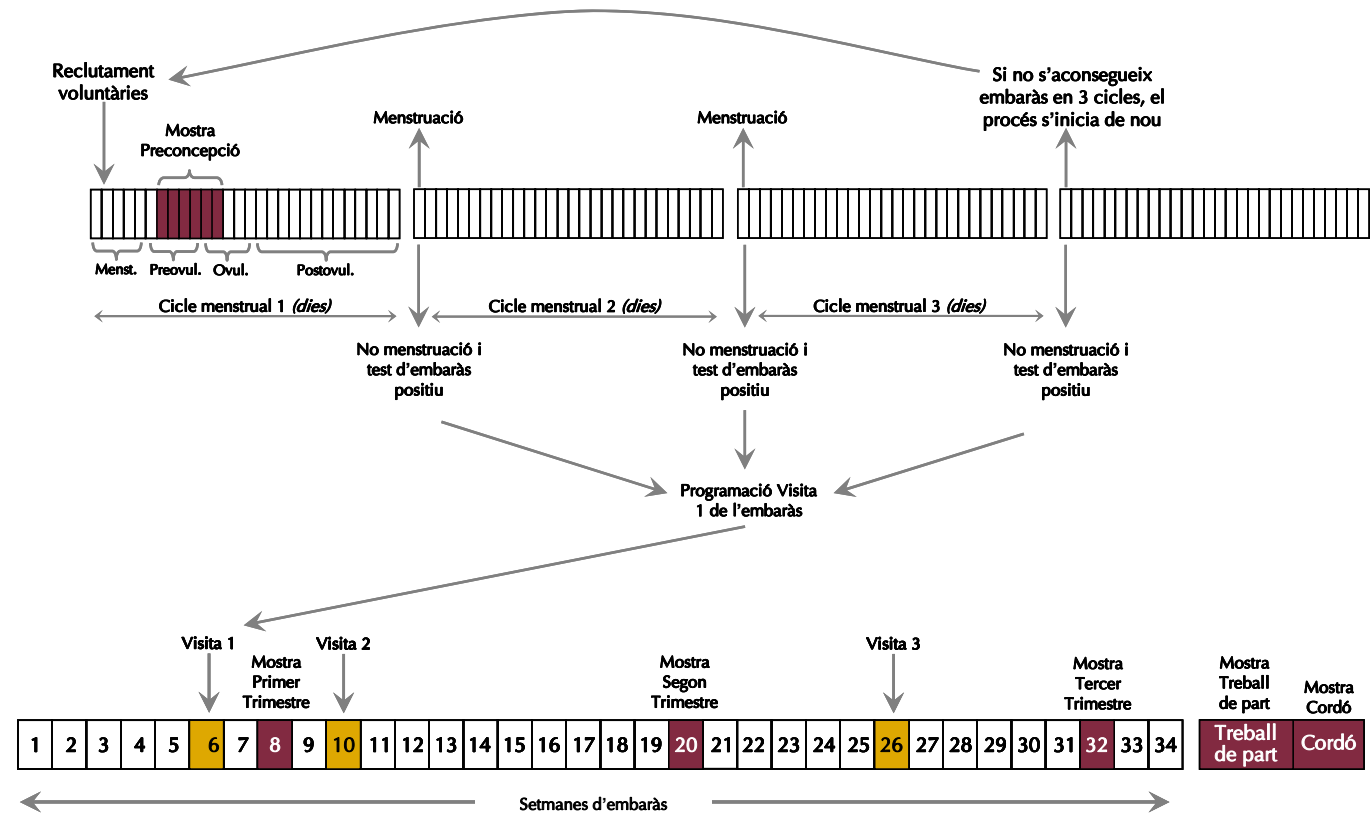


FIGURA 9. Disseny de l'Estudi PreC.

(Ext. Extracció, Menst.: menstruació, Preovul.: fase pre-ovulatòria, Ovul.: fase d'ovulació, Post-Ovul.: fase de post-ovulació)

La justificació del moment concret en què es realitzaven les extraccions durant la gestació, va ser per una banda la coincidència en el temps amb les analítiques rutinàries del seguiment obstètric. I per una altra, es perseguia obtenir dades bioquímiques en tres punts de la gestació el més separats possible; la mostra del primer trimestre per tal de tenir una analítica el més aviat possible dins el transcurs de la gestació, la segona extracció el més equidistant possible entre la primera i la tercera i, la del tercer trimestre per evitar la pèrdua de la mostra dels casos de naixements prematurs. A les setmanes sis, deu i vint-i-sis, coincidint amb la visita obstètrica rutinària, es registraven diferents mesures antropomètriques i, dades d'hàbits i estil de vida.

Estudi NUTCIR

NUTCIR és l'acrònim de "NUTrició i Creixement Intrauterí Retardat". Projecte portat a terme des del 2004 a la Unitat de MPSP de la FMCS de la URV en col·laboració amb la Unitat d'Obstetrícia i Ginecologia del HUSJR i l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona (HUJXXIII). Aquest projecte va ser dissenyat per tal d'avaluar la contribució de l'estat nutricional matern i de la funció placentària sobre el desenvolupament del creixement intrauterí retardat (CIR) i altres complicacions de l'embaràs; investigadora principal la Dra. Michelle Murphy. Es tracta d'un estudi longitudinal en què es segueix tot l'embaràs de les participants, fins el moment del part. Totes les participants controlen el seu embaràs al dos hospitals anteriorment citats. Són reclutades a la primera visita ginecològica davant de la seva sospita d'embaràs. Els criteris d'inclusió són: ser d'origen caucàsic (per raons culturals tant d'hàbits alimentaris com d'assistència als centres mèdics a les primeres etapes de l'embaràs) i estar embarassades de menys de dotze setmanes de gestació. Els criteris d'exclusió són: patir alguna malaltia crònica que afecti l'estat nutricional de la dona o que requereixi algun tipus de intervenció dietètica o nutricional, i prendre medicaments que interfereixen amb el metabolisme dels folats.

El reclutament de voluntàries es va iniciar l'octubre del 2004 al HUSJR i el gener del 2006 al HUJXXIII. A principis de març del 2007 s'havien reclutat 217 voluntàries al

HUSJR i 43 al HUIXIII, 19 havien patit un AE (12 de HUSJR i 7 de HUIXIII) i 3 havien abandonat l'estudi a HUSJR. Un total de 120 possibles candidates van ser excloses al HUSJR i 54 al HUIXIII, segons els criteris d'exclusió. En aquest període de temps 189 dones havien finalitzat el seu embaràs (178 al HUSJR i 11 a HUIXIII). Aquestes 189 dones són les que componen el grup de dones estudiades en aquesta tesi. Actualment es segueixen reclutant voluntàries.

El disseny de l'estudi (FIGURA 10), consisteix en la obtenció de 5 mostres sanguínies maternes i una del cordó. Cadascuna de les quatre primeres mostres maternes coincideixen en dia i hora amb les extraccions realitzades de forma rutinària en el control de l'embaràs. La primera extracció sanguínia es realitza entre la setmana vuit i dotze de l'embaràs (Mostra 1), la segona a la setmana quinze (Mostra 2), la tercera entre la setmana vint-i-quatre i vint-i-set (Mostra 3), i una última a la setmana trenta-quatre (Mostra 4). Durant el treball de part s'obté una cinquena mostra de la mare (Mostra treball de part). Finalment una última procedent de la vena del cordó umbilical una vegada el cordó és tallat després del naixement del nadó i amb la placenta a l'úter de la participant (Mostra cordó). A més a més, de cada participant, es va obtenir informació sobre els hàbits i estil de vida, mitjançant dues entrevistes, la primera a la vintena setmana de gestació i la segona a la setmana trenta-dos.

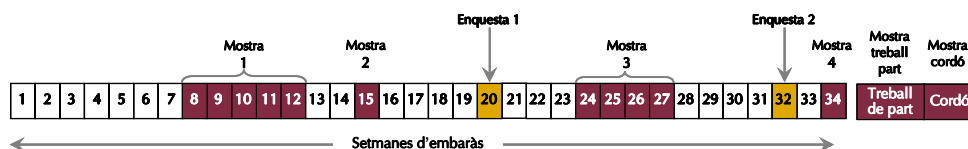


FIGURA 10. Disseny de l'Estudi NUTCIR.

1.2. Aspectes ètics

Els tres estudis van ser aprovats pels comitès d'ètica del HUSJR (PreC, Població, NUTCIR), del HUIXIII (NUTCIR) i de la Fundació Jordi Gol Gorina (Població). A tots els voluntaris se'ls va informar sobre la naturalesa de l'estudi en què se'ls convidava a

participar i van signar un consentiment informat tal com estableix la Declaració de Helsinki.^{226,227}

2. METODOLOGIA

2.1. *Obtenció de les fraccions sanguínies d'interès*

Les mostres sanguínies van ser processades als laboratoris de la FMCS, del Biobanc IISPV i de l'àrea de recerca del HUIJXXIII, depenent de l'estudi i del lloc on es van recollir. El protocol a seguir, va consistir en què abans de dues hores després de l'extracció de la mostra sanguínia, s'iniciés el procés d'obtenció de les diferents fraccions sanguínies per les posteriors determinacions bioquímiques. A la FIGURA 11 es representa un esquema de les fraccions recollides per cada tub d'extracció.

Del tub d'extracció amb heparina-liti i sense anticoagulant (tub sec) es va obtenir plasma-heparina-liti i sèrum, respectivament. Tots dos es van centrifugar 15 minuts a 4°C (tub heparina-liti) o temperatura ambient (tub sec) a 1100 x g. El plasma i el sèrum recuperats es va guardar a -80°C prèviament alíquotat en criotubs.

Del tub amb EDTA-K₃, una alíquota de sang total es va conservar amb una solució d'àcid ascòrbic 0.05M (*Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA*) per la conservació dels eritròcits en una dilució 1:10; tal com descriu el protocol de determinació microbiològica de folats eritrocitaris.²²⁸ Aquesta alíquota va ser congelada a -80°C. De la sang total restant al tub d'EDTA-K₃, es va obtenir el plasma centrifugant la mostra durant 15 minuts a 4°C a 1100 x g i es va congelar en alíquotes a -80°C. Amb la resta de contingut del tub d'EDTA-K₃, es van obtenir leucòcits. El primer pas va consistir en fer dos rentats amb PBS [(*Phosphate Buffered Saline*) 8 g de NaCl (*Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA*), 0.2 g de KCl (*Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA*), 1.44 g de Na₂HPO₄ (*Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland*) i 0.24 g de KH₂PO₄ (*Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland*)] en 100 mL d'aigua destil·lada.

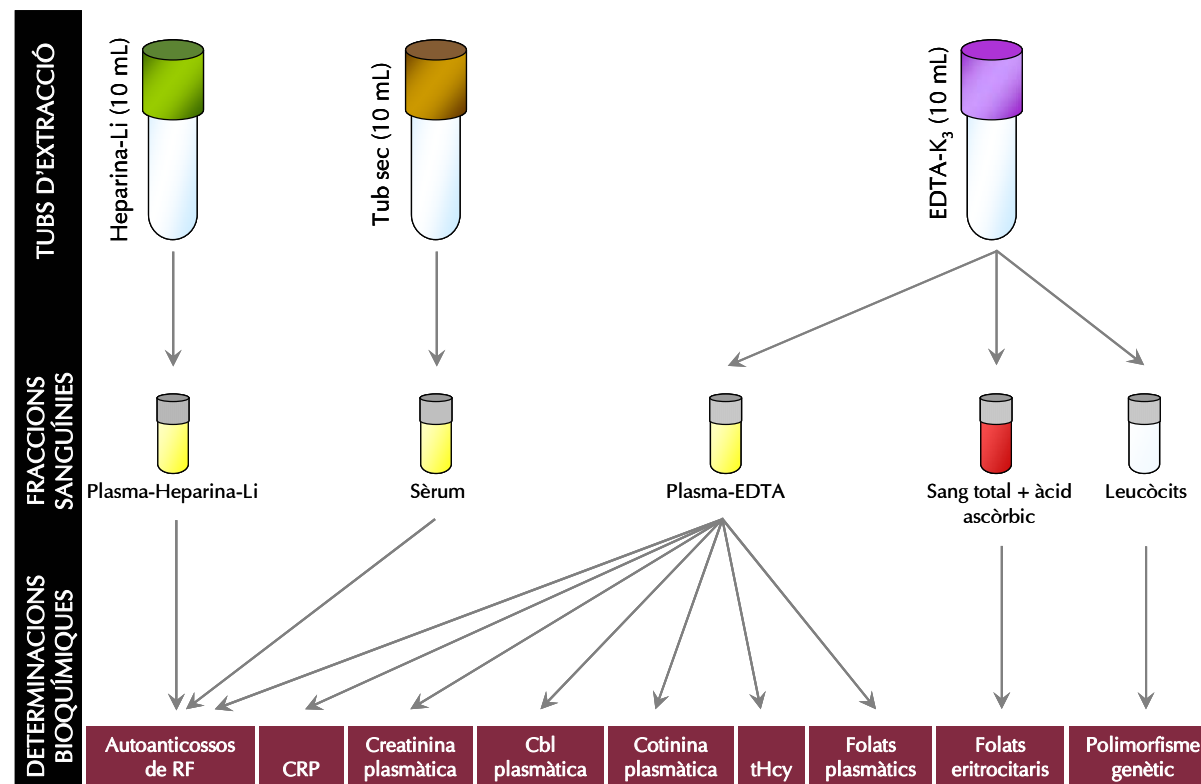


FIGURA 11. Fraccions sanguínies obtingudes a partir de cada tipus de tub d'extracció i determinacions bioquímiques i genètiques realitzades a partir de cada fracció.

(*RF*: receptor de folat, *CRP*: proteïna C-reactiva, *Cbl*: cobalamina, *EDTA*: etilendiamintetraacètic tripotàsic, *tHcy*: homocisteïna plasmàtica total en dejú).

Aquest rentat va consistir en omplir el tub d'EDTA-K₃ amb PBS, tancar el tub i barrejar suaument per inversió tot el contingut. Centrifugar a temperatura ambient durant 15 minuts a 1100 x g per aconseguir la separació dels diferents components. Es va descartar el PBS (capa superior transparent) i es va tornar a repetir el procés. Al final es va obtenir una fracció densa eritrocitària i per sobre d'aquesta una capa blanca de leucòcits. Aquesta capa leucocitària es va recuperar i es va transferir a 7 mL d'una solució a base de sals d'amoni [99% NH₄Cl (*Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland*) 131 mM, 1% NH₄CO₃ (*Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland*) 0.9 mM] per tal d'hemolitzar els possibles eritròcits arrossegats al recuperar la capa de leucòcits. Després d'un mínim de 20 minuts (barrejant suaument per inversió de tant en tant), es va centrifugar la barreja 15 minuts a 1100 x g a temperatura ambient. Es va descartar el sobrenedant i es va realitzar un nou rentat amb 10 mL d'aquesta solució hemolitzant i, es va centrifugar sota les mateixes condicions. Finalment es va descartar el sobrenedant i es va deixar assecat el tub amb el botó de leucòcits, sobre un paper absorbent. Una vegada assecat, es va resuspendre el botó amb 900 µL de PBS i es va transferir a un criotub, que es va guardar a -80°C.

D'aquestes fraccions sanguínies, es van mesurar les concentracions de creatinina plasmàtica, proteïna C-reactiva (CRP; *C-reactive protein*), Cbl plasmàtica, cotinina plasmàtica, tHcy, folats plasmàtics i eritrocitaris, es va determinar el genotip pel polimorfisme 677C→T *MTHFR* i la presència d'autoanticossos per RF (FIGURA 11).

Les mostres provinents de l'Estudi PreC han estat criopreservades a Unitat de MPSP de la URV. En el cas de les mostres de Població i del NUTCIR, al Biobanc IISPV.

2.2. Extracció d'ADN a partir de mostres leucocitàries congelades

A partir de les mostres leucocitàries congelades amb PBS, es va extreure ADN, per les posteriors determinacions genètiques. Aquest procés es va realitzar amb el kit d'extracció *Puregen* (*Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA*). Es tracta d'un procés de tres passos: lisi de les cèl·lules leucocitàries, precipitació proteica i hidratació de l'ADN genòmic.

Lisi de cèl·lules leucocitàries: L'objectiu d'aquest pas consisteix en trencar la membrana plasmàtica de la cèl·lula leucocitària, per tal d'obtenir totes les fraccions cel·lulars en solució. Traspasar l'alíquota de leucòcits en solució de PBS prèviament descongelada a 10 mL de *Cell Lysis Solution* (ref. D-50K2, Genra Systems, Minneapolis, MN, USA). Guardar a les fosques i de tant en tant barrejar la mostra suaument per inversió, fins que la solució adopti una densitat més lleugera que inicialment. En aquest punt, les cèl·lules estan completament lliades i per tant la mostra preparada per procedir amb el segon pas de l'extracció d'ADN. El temps de permanència en *Cell Lysis Solution*, dependrà de la quantitat de material leucocitari. És important a tenir en compte que normalment els botons leucocitaris de vena de cordó umbilical doblen o tripliquen en volum als d'origen matern. De mitjana, un botó obtingut de 10 mL de sang total triga 1 mes a estar preparat per poder continuar amb la precipitació proteica (pas següent) en el cas de la sang materna, i uns 3 mesos el de cordó.

Precipitació proteica: L'objectiu d'aquest pas és l'obtenció l'ADN sense impureses. En un tub cònic de plàstic de 30 mL autoclavat prèviament, afegir 3.33 mL de *Protein Precipitation Solution* (ref. D-50K3, Genra Systems, Minneapolis, MN, USA) en el cas de les mostres maternes i 6.66 mL en el cas dels cordons, i tota la barreja obtinguda en el pas anterior. Tapar i barrejar amb l'ajuda d'un agitador de tubs a màxima velocitat durant 30 segons en el cas de les mostres maternes i 1 minut en el cas de les de cordó. Immediatament després submergir el tub cònic en gel picat, durant un mínim de 30 minuts. Transcorregut aquest temps, procurant de no moure la solució dels tubs cònics, centrifugar durant 15 minuts a 4°C a 18000 x g per tal que es precipitin totes les restes cel·lulars de major densitat. Recuperar el sobrenedant, i afegir-lo a 10 mL d'isopropanol (2-propanol) fred, per tal que es produeixi la condensació de l'ADN. Tapar el tub cònic i barrejar el seu contingut per inversió suaument unes 50 vegades fins que es visualitzi la medusa d'ADN. Recuperar l'ADN després de centrifugar la mostra 3 minuts a 4°C a 18000 x g, eliminant el sobrenedant. Deixar evaporar les restes d'isopropanol invertint el tub cònic sobre paper absorbent. Passat el temps necessari, afegir 10 mL d'etanol al 70% fred per tal d'eliminar les possibles restes de reactius que puguin haver quedat. Per tal de

resuspendre el botó d'ADN i netejar bé les parets del tub cònic, barrejar per inversió suaument, fins que el botó es desenganxi de la paret. Eliminar l'etanol, precipitant l'ADN centrifugant la barreja 3.5 minuts a 4°C a 18000 x g. Deixar evaporar les restes d'etanol del tub cònic a temperatura ambient uns 30-40 minuts.

Hidratació de l'ADN genòmic: Afegir 600 µL d'*ADN Hydration Solution* (ref. *D-50K4*, *Genra Systems, Minneapolis, MN, USA*), al tub cònic que conté el botó d'ADN. Deixar hidratar l'ADN uns 3-4 dies a temperatura ambient i en agitació. I guardar en un criotub a 4°C, fins el moment de les determinacions genètiques.

2.3. Determinació de la homocisteïna plasmàtica total en dejú (tHcy)

Per determinar la concentració de tHcy, es va utilitzar l'immunoassaig de polarització de la fluorescència. Per les mostres procedents dels Estudis Poblacional i PreC, es va utilitzar el kit *IMx Homocysteine* (*Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA*), amb límit de detecció inferior a 0.5 µmol/L, coeficient de variació intraassaig 2.1% i coeficient de variació interassaig 3.2%. Per les mostres de l'Estudi NUTCIR es va utilitzar el kit *AxSYM Homocysteine* (*Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA*), amb un límit de detecció inferior o igual a 0.8 µmol/L, i amb un coeficient de variació total inferior al 5%.

2.4. Determinació dels folats plasmàtics i eritrocitaris

Es van determinar les concentracions de folat plasmàtic i eritrocitari mitjançant els assaigs microbiològics amb *Lactobacillus casei*.²²⁸ Les mostres de l'Estudi Poblacional van ser assajades al Departament de Bioquímica de Trinity College, Dublín, Irlanda. Per calcular la concentració de folat eritrocitari és necessari l'hematòcrit. La fórmula pel seu càlcul és: folat total sanguini / hematòcrit. Els coeficients de variació van ser 7.1% intraassaig i 10.7% interassaig. Les mostres de l'estudi NUTCIR, van ser analitzades als laboratoris de Bevitall AS, Bergen, Noruega. En aquestes últimes es va utilitzar el mateix mètode; però adaptat a un format de microplaca per tal de

robotitzar la tècnica. La sensibilitat de la tècnica és de 2 nmol/L, amb coeficients de variació del 4% intraassaig i del 5% interassaig.

2.5. Determinació de la cobalamina (Cbl) plasmàtica

Determinació de la concentració de Cbl plasmàtica amb l'assaig microbiològic utilitzant el *Lactobacillus leichmannii*.²²⁹ Les mostres de l'Estudi Poblacional van ser assajades al Departament de Medicina Clínica de Trinity College, Dublín, Irlanda, amb 7.1% i 10.7% de coeficients de variació intraassaig i interassaig, respectivament. Les mostres de l'estudi NUTCIR, van ser analitzades als laboratoris de Bevitall AS, Bergen, Noruega. En aquestes últimes es va utilitzar el mateix mètode però que ha estat adaptat a un format de microplaca per tal de robotitzar la tècnica. La sensibilitat de la tècnica és de 30 pmol/L, amb coeficients de variació intra-assaig i inter-assaig del 4% i 5%, respectivament.

2.6. Determinació de la proteïna C-reactiva (CRP)

La CRP és una proteïna sintetitzada pel fetge, que augmenta com a resultat de la fase aguda d'un procés inflamatori. Per tant, la seva mesura és un marcador d'inflamació. Es va determinar la concentració de CRP mitjançant un immunoassaig turbidimètric, amb els reactius de Biokit (*Quantex hs-CRP kit; Biokit S.A., Barcelona, Spain*). Amb un límit de detecció 0.10 mg/L i coeficients de variació intraassaig i interassaig inferiors al 2% i 4%, respectivament.²³⁰ Es va utilitzar l'analitzador Ilab 1800 (*Instrumentation Laboratories, Milan, Italy*).

2.7. Determinació de la creatinina plasmàtica

La creatinina és un producte residual del fosfat de creatina, eliminat al plasma sanguini i filtrat al glomèrul. Finalment és excretat a través de la orina. Per tant, la seva concentració, informa sobre l'estat de la funció renal. Per la seva determinació s'utilitza el mètode de Jaffé modificat. Es basa en la reacció de la creatinina amb una solució de picrat en medi alcalí. El resultat és la formació d'un complex vermellós

(complex de Janowski), que es mesura fotomètricament, a una longitud d'ona de 510 nm. S'ha utilitzat el kit de QCA (*ref. 998891, Química Clínica Aplicada S.A., Amposta, Espanya*), amb coeficients de variació intrassaig de 1.72% i interassaig del 2.11%, i l'analitzador Cobas Mira (*Roche, Basel, Switzerland*).

2.8. Determinació de la cotinina plasmàtica

La cotinina és un metabolit estable de la nicotina. S'utilitza com a biomarcador de l'ús i exposició al tabac. Les mostres van ser analitzades als laboratoris de Bevital AS, Bergen, Noruega. Es va utilitzar el mètode LC-MS/MS,²³¹ amb una sensibilitat de 1nmol/L, amb coeficients de variació del 2-3% intraassaig i del 6% interassaig. La concentració de cotinina plasmàtica ha permès classificar les participants de l'Estudi NUTCIR i mesurar l'exposició del cordó a la nicotina segons el seu hàbit tabàquic: <5nmol/L com no fumadora, 5-85 nmol/L com fumadora passiva i > 85 nmol/L com fumadora activa.

2.9. Determinació del polimorfisme 677C→T del gen 5,10-metilètetrahidrofolat reductasa (MTHFR)

Es va determinar el genotip del polimorfisme 677C→T *MTHFR*, seguint la tècnica anteriorment descrita.⁴⁵ La determinació de la genètica dels individus que conformen la col·lecció de les mostres de l'Estudi Poblacional es va realitzar a la FMCS segun el mètode anteriorment citat.

2.10. Anàlisi estadística

L'anàlisi estadística s'ha portat a terme utilitzant el programa estadístic SPSS (*Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA*) versió 15.0. En cada capítol hi ha una descripció detallada de l'anàlisi estadística emprada.



CAPÍTOL 1

DETECCIÓ D'AUTOANTICOSSOS CONTRA I D'UNIÓ DE RECEPTORS DE FOLAT

*(Estada al laboratori del Dr. Edward V Quadros, SUNY,
Brooklyn, NY 2007)*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

CAPÍTOL 1

DETECCIÓ D'AUTOANTICOSSOS CONTRA I D'UNIÓ DE RECEPTORS DE FOLAT

1. Introducció

La tècnica de detecció d'autoanticossos pels RF va ser descrita per primera vegada al 2004 per Rothenberg i els seus col·laboradors.²⁰⁹ Aquesta es basava en la inhibició competitiva entre els autoanticossos presents en les mostres sèriques i l'àcid fòlic marcat radioactivament pel lloc específic del RF per la unió del folat (FIGURA 12). Permetia la detecció i quantificació de la concentració d'autoanticossos contra RF. Posteriorment la tècnica ha estat modificada.²⁰⁴ Breument, la tècnica consisteix en assajar una concentració de RF purificats a partir de membranes cel·lulars de teixit placentari junt amb àcid fòlic marcat radioactivament. La mesura de la quantitat de RF blocats per autoanticossos és inversa a la radioactivitat emesa per l'àcid fòlic unit al RF. Aquesta tècnica no permetia diferenciar entre autoanticossos capaços de blocar el RF- α del RF- β , o ambdós a la vegada, ja que utilitzaven RF d'origen placentari, on s'expressen les dues isoformes de RF. En tots els treballs del grup s'han utilitzat RF d'origen placentari.^{204,205,209,211,212,215,218}

Des del 1967 se sap de la presència de FBP a la llet bovina.²³² La seva concentració en llet fresca (sense pasteuritzar) és de 8 mg/L.²³³ La seva seqüència d'aminoàcids²³⁴ presenta homologia amb la FBP de llet humana.²³⁵ Aquesta última correspon a la isoforma RF- α soluble procedent de l'epiteli mamari. Per tant, es pot afirmar que la llet de vaca conté FBP corresponents als RF- α d'origen humà.

Es planteja també la possibilitat de detecció d'autoanticossos que puguin unir-se a qualsevol localització de la superfície del RF. Aquesta tècnica no ha estat descrita en la literatura anteriorment (FIGURA 12D).

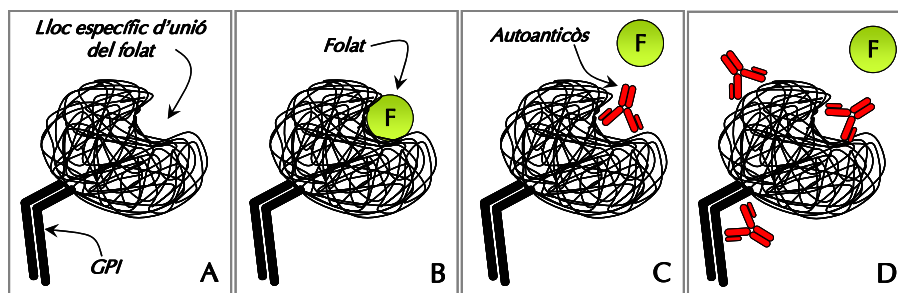


FIGURA 12. Esquema del receptor de folat.

Es caracteritza per tenir un lloc específic d'unió del folat (A, B). En presència d'autoanticòs que s'uneixin al lloc específic d'unió (C), el folat no podrà unir-se i per tant aquest no podrà ser internalitzat a la cèl·lula. Els panells A, B i C il·lustren el concepte de la tècnica del "blocking". També cabria la possibilitat de que hi hagués autoanticòs que s'unissin a qualsevol regió de la superfície del receptor de folat (D). El panell D fa referència al concepte de la tècnica del "binding".

Per tal d'evitar la confusió, els autoanticòs que es troben blocant el RF els s'anomenaran "autoanticòs contra RF", mentre que els que es troben units a qualsevol altra part de la superfície del RF, els anomenarem "autoanticòs d'unió de RF".

Aquestes tècniques, s'han desenvolupat al laboratori del Dr. Quadros de State University of New York (SUNY) - Downstate Medical Center, Brooklyn, Nova York. Un dels objectius d'aquesta tesi, s'ha centrat en el desenvolupament d'aquestes tècniques. Es van aplicar aquestes tècniques a les 1971 mostres analitzades.

Aquest capítol es centra en la descripció detallada de les tècniques utilitzades en la determinació d'autoanticòs pels RF.

2. Objectiu particular

- Descripció i crítica detallada de la posada a punt de les tècniques de detecció d'autoanticossos (*blocking* i *binding*) i creació de protocols de laboratori.

Tots els protocols als que es fa referència en aquest capítol, es troben a l'**ANNEX 1**.

3. Purificació de receptors de folat

A la literatura ha estat descrita la purificació de RF a partir de cultius cel·lulars²³⁶ o de teixit de placenta¹⁷¹ humana entre d'altres. I també de teixits d'origen animal com placenta de rata.²³⁷ Per la determinació de presència d'autoanticossos contra i d'unió de RF, és necessari tenir una reserva de RF purificats. Fins la data, s'ha utilitzat teixit placentari per la obtenció d'aquests RF.^{204,209} A la placenta hi ha presència de RF- α i RF- β , fet que no assegura la identificació específica del tipus de RF bloquejat. Això s'evita utilitzant una font de RF que contingui un sol tipus de RF. Fins el moment, s'han estudiat col·leccions de mostres relativament petites. Però el processament de major volum de mostres, ha fet recomanable buscar una font de RF més accessible i amb menor dificultat de processament. Per tot això, aquesta tècnica s'ha adaptat, modificant el substrat original d'aquests RF. El substrat que reuneix les condicions desitjades és la llet d'origen boví.

Ha estat descrit l'aïllament de RF procedents de la llet.¹⁵⁹ Aquí es descriu amb detall la metodologia seguida per la purificació de RF a partir de la llet bovina, la qual té notables modificacions respecte la publicada. Els RF que s'obtenen de la llet bovina, són del tipus RF- α . El tractament de la pasteurització afavoreix la reducció de la concentració de RF i de la seva capacitat d'unió respecte la llet no processada.^{238,239} Aquest efecte és més notable en la llet pasteuritzada a ultra-altes temperatures (UHT; *Ultra-High temperatures*) que la pasteuritzada a menor temperatura (HTST; *High Temperature/Short Time*). Mitjançant la tècnica de purificació de RF de la llet descrita aquí, es descarta la fracció de RF desnaturalitzats i, els RF que s'obtenen tenen

capacitat d'unió al folat/àcid fòlic i són 100% funcionals. Aquesta tècnica consisteix en dues purificacions.

3.1. Primera Purificació

Es parteix de 100 mL de llet de vaca, de la que es comercialitza. Consisteix en tres fases:

EASE 1: Preparació de la mostra

A 100mL de llet de vaca, s'afegiran 2 mL de *Triton X-100 Ultra*grade (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ, USA). El *Triton X-100 Ultra*grade, és un detergent surfactant no iònic amb caràcter anfòric. Aquesta propietat permet que les proteïnes que estan unides a lípids es solubilitzin sense perdre la seva conformació. El RF és una d'aquestes proteïnes, doncs es troba ancorada a la bicapa lipídica de la membrana plasmàtica a través d'una GPI. El *Triton X-100 Ultra*grade, desestabilitzarà les micel·les que contenen aquests RF, formant-se d'altres de més petites. La presència de *Triton X-100 Ultra*grade de forma més o menys constant al llarg de tot el procés, afavorirà la reducció de mida d'aquestes micel·les de forma progressiva. El que es pretén doncs, és que les noves micel·les que es formin continguin menor número de RF i, que no es vegi alterada la conformació estructural d'aquests RF.

El següent pas consisteix en obtenir RF lliures de folats. Això s'aconsegueix reduint el pH de la mostra a 4.5 amb àcid acètic glacial 18M (*J.T. Baker Phillipsburg, NJ, USA*). Per tal d'eliminar el folat lliure de la llet (el que es troba de forma soluble a la llet i el que s'ha dissociat dels RF), s'afegeix a la mescla 2 g de carboni activat (*Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA*), que adsorbirà el folat. Es centrifuga la barreja a 40248 x g durant 5 minuts (per precipitar el carboni activat on quedaran retinguts el folat i totes les seves proteïnes de gran pes molecular). Transcorregut aquest temps es giren els tubs 180 graus i es tornen a centrifugar en les mateixes condicions, perquè el precipitat es faci més compacte. Es recupera el sobrenedant en un vas de precipitats, filtrant-lo amb l'ajuda d'un embut i paper absorbent. Immediatament després es neutralitza el seu pH, fins a 7.4 amb NaOH 5N (*Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA*), amb l'ajuda d'un pH-metre (afegir al vas de precipitats un imant agitador i

sobre un agitador magnètic). A aquest filtrat encara resten partícules de carboni activat. Per això es torna a centrifugar la mostra sota les mateixes condicions que abans i es torna a filtrar de la mateixa manera. Aquest últim filtrat es recuperarà en una ampolla. Guardar una alíquota de 500 µL d'aquest filtrat a 4°C (mostra pre-matriu).

FASE 2: Retenció de receptors de folat

El següent pas consisteix en la obtenció dels RF de la barreja, amb l'ajuda d'una matriu d'afinitat pel APG (*GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden*). Aquesta matriu consisteix en esferes de *sepharose* que tenen associades molècules de APG, i es caracteritza per tenir una capacitat d'unió de fins a 1mg de receptor d'apo-folat (RF sense folat unit) per mL de matriu. Aquesta matriu es troba en una columna de 10 mL de capacitat volumètrica. El primer pas consistirà en netejar la matriu, fent passar a través d'ella tampó fosfat-1 (**Protocol 1**). Una vegada la matriu no contingui tampó es traspasa a l'ampolla que conté el filtrat obtingut anteriorment. Es tanca l'ampolla i es manté amb agitació a baixa velocitat per tal de què es produeixi la unió dels RF del filtrat als APG de la matriu, durant 20 minuts. Transcorregut aquest temps, es traspasa tota la barreja (mostra més matriu) a la columna. Es recupera l'eluat en un vas de precipitats. Es guarda una alíquota de 500 µL a 4°C ("mostra post-matriu"), per conèixer la quantitat de RF que s'ha perdut, respecte la fase anterior (mostra pre-matriu).

FASE 3: Recuperació de receptors de folat

A la matriu, a més a més dels RF units al APG, resten impureses que s'han d'eliminar mitjançant 4 rentats diferents:

Rentat 1: 40 mL de tampó fosfat-1 (Protocol 1)

Com la capacitat volumètrica de la columna és de 10 mL, omplir 4 vegades la columna amb aquesta solució. Amb aquest primer rentat es pretén eliminar qualsevol proteïna no unida a la matriu.

Rentat 2: 10 mL de tampó fosfat-1/NaCl (Protocol 4)

El NaCl, serà el responsable de la dissociació de proteïnes unides per interaccions iòniques a la matriu. La unió dels RF a la matriu, no es veu afectada pel NaCl a aquesta concentració (1M) (a concentració superior els RF es dissocien).

Rentat 3: 20 mL de tampó fosfat-1 (Protocol 1)

Permet eliminar les proteïnes que s'han dissociat de la matriu en el rentat anterior.

Rentat 4: 20 mL de tampó fosfat-2 (Protocol 5)

El NaPO_4 0.1M és un tampó molt fort, per aquesta raó es dilueix. Per poder alliberar els RF units a la matriu posteriorment, caldrà tractar la matriu amb un pH àcid. Però aquest procés s'ha de fer lentament. Aquest rentat té la funció de iniciar la reducció de la concentració de NaPO_4 de la matriu. D'aquesta manera el tractament àcid posterior no caldrà que sigui tan agressiu.

Arribat aquest punt, a la matriu només hi ha els RF units. El següent pas consisteix en recuperar els RF, acidificant la matriu, i per tant dissociant les unions de APG-RF, amb l'ajuda de tampó àcid-1 (**Protocol 8**). Tancada la columna, s'afegeix en ella 5 mL d'aquesta solució. S'ha de procurar que penetri bé a la matriu (pipetejar la matriu amb el tampó àcid-1 diverses vegades). Deixar que actuï l'àcid durant 1 minut, per tal d'assegurar el màxim de dissociacions APG-RF. Passat aquest temps es recupera l'eluat obrint de nou la columna, i ràpidament es neutralitzarà el seu pH afegint a l'eluat 1 mL de NaPO_4 dibàsic 1M (**Protocol 11**). Es torna a tancar la columna i es procedeix de la mateixa manera a recuperar un segon eluat afegint de nou 5 mL de tampó àcid-1 i la posterior neutralització. Es repeteixen aquests passos fins a recuperar un total de 4 eluats.

Finalment procedir a netejar la matriu, per tal d'eliminar qualsevol resta que hagi pogut quedar. Es fa mitjançant dos passos. Primer passant a través de la columna 25 mL d'urea 6M (**Protocol 12**), per tal d'eliminar qualsevol impuresa unida a la matriu. I després passant 25 mL NaCl 4M (**Protocol 13**), que eliminarà qualsevol interacció

iònica existent amb la matriu. Finalment, fer passar 10 mL de tampó fosfat-1 (**Protocol 1**). Així, la matriu queda neta i preparada per procedir amb una segona purificació.

3.2. Segona Purificació

Els quatre eluats recuperats en la primera purificació es barregen en un tub tipus *Falcon* de 50 mL amb tap de rosca i es torna a repetir el procés de purificació, a partir de la fase 2 de la primera purificació. Com ara el volum és menor, enlloc de 20 minuts es deixarà que els RF s'uneixin a la matriu durant 15 minuts. El procediment és idèntic al descrit en la primera purificació. Al final s'obtenen 4 eluats de RF sense impureses. L'afinitat d'aquests RF és molt alta, i 100% funcional, i de llarga durabilitat. Una vegada acabada tota la purificació, s'ha de determinar la concentració de RF en els diferents punts del procés de purificació.

3.3. Quantificació de la purificació de receptors de folat

Valoració del rendiment del procés de purificació de RF, a través de la quantificació de RF en les mostres pre-matriu i post-matriu de la primera purificació guardades a 4°C. De la mostra pre-matriu i de la post-matriu, s'assagen diferents volums tal com s'indica en les **TAULES 2 i 3**.

TAULA 2. Esquema de l'assaig de la mostra pre-matriu i resultats obtinguts.

Tub	Tampó base (µL)	RF (µL)	[³ H]-APG (µL)	ASB-TC al 10% (µL)	Carboni activat/dextrà al 10% (µL)	CPM
Total	450	0	50	25	250	954
1	425	25	50	25	250	14299
2	350	100	50	25	250	14407

RF: receptor de folat, **[³H]-APG:** àcid pteroilglutàmic marcat amb l'isòtop estable tritó, **ASB-TC al 10%:** albúmina sèrica bovina tractada amb carboni activat al 10%, **CPM:** emissions per minut.

En un tub tipus *Eppendorf* de 2 mL, dispensar un volum de tampó base (**Protocol 14**), un volum de RF purificats (especificat a **TAULES 2 i 3**) i 50 µL APG marcat amb l'isòtop estable tritó ([³H]) ([³H]-PGA) (*Moravek Biochemicals, Inc. Brea, CA, USA*), de 32.9

Ci/mmol d'activitat específica i puresa radioactiva del 97.9%. El volum total de tampó base, RF i [³H]-PGA, ha de ser de 500 µL. S'ha de barrejar bé amb un agitador de tubs. Es deixa incubar 25 minuts i s'afegeixen 25 µL de ASB-TC al 10% (**Protocol 15**). És necessari barrejar bé. Afegir a cadascun dels tubs 250 µL de carboni/dextrà al 10% (**Protocol 17**).

TAULA 3. Esquema de l'assaig de la mostra post-matriu i resultats obtinguts.

Tub	Tampó base (µL)	RF (µL)	[³ H]-APG (µL)	ASB-TC al 10% (µL)	Carboni activat/dextrà al 10% (µL)	CPM
1	450	25	50	25	250	3976
2	400	50	50	25	250	6418
3	350	100	50	25	250	10460

RF: receptor de folat, [³H]-APG: àcid pteroilglutàmic marcat amb l'isòtop estable tritó, ASB-TC al 10%: albúmina sèrica bovina tractada amb carboni activat al 10%, CPM: emissions per minut.

El carboni activat és un sòlid ideal per adsorbir el folat, doncs aquest pot arribar a tenir una superfície interna entre 500-1500 m²/g. Com el que es pretén és adsorbir específicament només el [³H]-PGA sobrant que no s'ha unit a cap RF, s'ha d'eliminar la possibilitat d'unió de molècules més grans com ho són els RF. Això s'aconsegueix recobrint la superfície del carboni activat amb dextrà. El dextrà, és un polisacàrid d'origen bacterià amb caràcter hidròfil i un alt pes molecular; per tant ocupa un gran volum. El dextrà protegeix el carboni activat, impeding la unió de molècules grans, però si que permet la unió del [³H]-PGA. En el cas que el dextrà no fes la seva funció de forma correcta, i per tant deixés més superfície lliure de carboni activat al descobert, la ASB-TC al 10% seria la molècula abundant que s'adsorbiria abans que els RF. Barrejar bé amb l'ajuda d'un agitador de tubs i centrifugar a 15339 x g durant 3-4 minuts. Per facilitar després la recuperació del sobrenedant, col·locar els tubs tipus *Eppendorf* a la centrífuga amb l'obertura del tap el més allunyat possible del centre del rotor. Al finalitzar girar els tubs a la centrífuga 180 graus (obertura del tap del tub el més a prop possible del centre del rotor). I es torna a centrifugar amb les mateixes condicions. Es recupera el sobrenedant, i es transfereix a 15 mL de

scintillation fluid (MP Biochemicals, Irvine, CA, USA) en un vial de lectura (VWR, West Chester, PA, USA) i es barreja bé. Es procedirà a la lectura de la radioactivitat emesa pel $[^3\text{H}]$ -PGA/minut [(emissions ó contatges per minut (CPM))] de la mostra amb l'analitzador *TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer Model 1900CA* (Packard Instrument Company, Downers Grove, IL, USA). El $[^3\text{H}]$ -PGA s'uneix al RF en una proporció 1:1, per tant, les emissions del $[^3\text{H}]$ -PGA informen sobre el número de RF que conté la mostra.

Entre la bateria de tubs corresponents de la mostra pre-matriu (TAULA 2), s'assaja una mostra on no s'afegeix RF, és el tub "Total", el quan proporciona el *background* de l'assaig. Els valors de CPM obtinguts estan resumits a les TAULES 2 i 3. Els CPM obtinguts a l'assajar 25 μL i 100 μL de la mostra pre-matriu (TAULA 2) són de l'ordre de 14000 CPM. Això significa, que a un volum de 25 μL hi ha una saturació de llocs ocupats pel $[^3\text{H}]$ -APG, és a dir, el total de RF presents a la mostra. A un mateix volum de 25 μL però ara de la mostra post-matriu (TAULA 3), el resultat és de 3976 CPM. La diferència d'aquests dos valors és 10323 CPM. Aquest valor indica la quantitat de RF retintut a la matriu d'afinitat APG. Aquest valor es pot convertir en pg de RF a partir de diferents factors de conversió. El primer factor de conversió que s'utilitzarà serà la relació numèrica de pg de $[^3\text{H}]$ -APG i CPM. Aquesta relació vindrà establerta per la casa comercial que distribueix el $[^3\text{H}]$ -APG. En aquest cas, per la quantificació de RF derivats de la purificació de RF, es va utilitzar un $[^3\text{H}]$ -APG que tenia una relació de 1pg $[^3\text{H}]$ -APG = 66 CPM. També s'utilitzaran els factors de conversió: pes molecular de l'APG \approx 441 pg/pmol i pes molecular del RF \approx 36000 pg/pmol. La matriu ha retintut 12.76 ng de RF.

Aquests RF purificats seran utilitzats en les tècniques del *blocking* i del *binding*. En el cas de la tècnica del *blocking*, com s'explica més endavant, s'afegeix una quantitat coneguda de RF, entre 10000-15000 CPM. En aquest punt del procés de purificació de RF, s'ha de determinar la concentració de RF en cadascun dels 4 eluats obtinguts en la segona purificació.

Com els primers eluats són més concentrats que els últims, es prepararà una bateria de dilucions per cada eluat. Les dilucions es prepararan amb tampó base (**Protocol 14**). El valor de CPM de cada dilució, proporcionarà la informació necessària, per tal de determinar la dilució ideal a la que s'ha de portar cada eluat. Una vegada determinada la dilució ideal, es diluirà l'eluat i es prepararan alíquotes d'aquestes dilucions en tubs tipus *Eppendorf* i es guardaran a -20°C , fins el seu ús en la tècnica del *blocking*. La **FIGURA 13** mostra de forma gràfica les dilucions a realitzar a partir dels tres primers eluats obtinguts en la segona purificació. El quart eluat no es diluirà.

De la mateixa manera que s'assajaven les mostres pre-matriu i post-matriu, s'assagen totes les dilucions preparades. De cada dilució preparada, s'assaja $10\ \mu\text{L}$ de RF. La **TAULA 4** mostra els volums de cadascun dels components utilitzats en l'assaig i els resultats obtinguts. Entre la bateria de dilucions s'assaja un tub "Total" en el que no s'inclou mostra de RF, que proporciona el *background* de l'assaig. Els CPM obtinguts de la lectura de les dilucions de cada eluat, serviran de guia per determinar si l'eluat s'ha de diluir o no. I en el cas que s'hagi de diluir, quina dilució és la més adequada. A la **TAULA 4** es pot observar que les dilucions A (Dilució 1:10 de l'eluat 1), B (Dilució 1:20 de l'eluat 1), C (Dilució 1:40 de l'eluat 1), F (Dilució 1:10 de l'eluat 2) i M (Eluat 4), presenten una quantitat de RF entre 10000 i 15000 CPM (quantitat de RF que afegim a les mostres en l'assaig del *blocking*). Es procedirà a diluir l'eluat 1 depenent de la quantitat d'alíquotes que es necessitin per l'assaig del *blocking* (dilució 1:10, 1:20 ó 1:40). L'eluat 2 es diluirà 10 vegades i l'eluat 4 no caldrà diluir-lo. Es prepararan alíquotes en tubs tipus *Eppendorf*, i es guardaran a -20°C . Referent a l'eluat 3, el fet de no trobar cap dilució amb un valor de CPM dins el interval desitjat, indica que no caldria diluir-la, fet que és confirmat pel valor obtingut de l'eluat 4 (11804 CPM), menys concentrat que l'eluat 3. Per tant, per confirmar-ho, s'assajarà $10\ \mu\text{L}$ d'eluat 3. En el cas de què això es confirmi, es prepararan alíquotes de RF purificats de l'eluat 3 sense diluir.

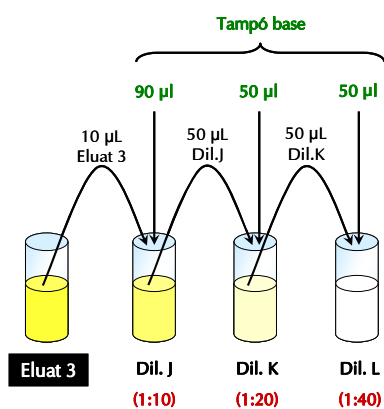
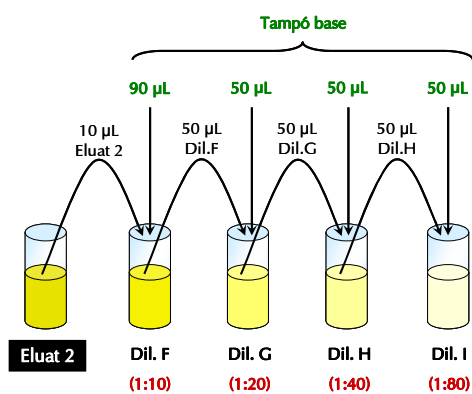
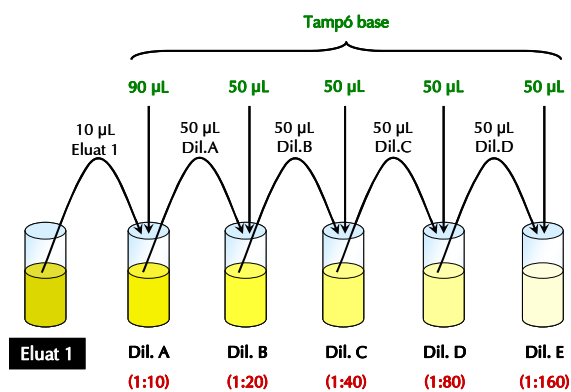


FIGURA 13. Bateria de dilucions dels tres primers eluats obtinguts en la purificació de receptors de folat.

TAULA 4. Esquema de l'assaig dels eluats de la purificació de receptors de folat.

Eluat	Dilució	Tampó base (µL)	Volum dilució (µL)	[³ H]-APG (µL)	ASB-TC al 10% (µL)	Carboni activat/dextrà al 10% (µL)	CPM
-	Total	450	0	50	25	250	5619
1	A	440	10	50	25	250	13025
	B	440	10	50	25	250	13797
	C	440	10	50	25	250	12533
	D	440	10	50	25	250	7934
	E	440	10	50	25	250	8075
2	F	440	10	50	25	250	12864
	G	440	10	50	25	250	9712
	H	440	10	50	25	250	8106
	I	440	10	50	25	250	6835
3	J	440	10	50	25	250	8281
	K	440	10	50	25	250	7328
	L	440	10	50	25	250	6386
4	M	440	10	50	25	250	11804

[³H]-APG: àcid pteroilglutàmic marcat amb l'isòtop estable tritó, ASB-TC al 10%: albúmina sèrica bovina tractada amb carboni activat al 10%, CPM: contatges/emissions per minut.

Les alíquotes de RF purificats poden mantenir-se congelades a -20°C fins a 6-8 mesos. Referent al *blocking* es recomana guardar alíquotes de volums molt petits, ja que una vegada l'alíquota es descongeli, el sobrant es descartarà. Els RF es degraden quan són exposats a cicles repetits de congelació i descongelació. Referent a la tècnica del *binding*, guardar alíquotes a través de les quals, la dilució de RF en tampó fosfat (**Protocol 1**), haurà de contenir una concentració d'entre 10-50 $\mu\text{g/mL}$ de RF.

Tant pels assaigs de *blocking* com de *binding*, pot utilitzar-se sèrum o plasma, i en aquest últim cas plasma-EDTA o plasma-heparina. Poden emmagatzemar-se les mostres biològiques a -20°C o -80°C fins el seu processament, però sempre evitant cicles de congelar-descongelar. Guardar les mostres a aquestes baixes temperatures, aporta menor pèrdua d'activitat dels autoanticossos que puguin contenir, respecte si han estat emmagatzemades a 4°C .

4. Assaig de detecció d'autoanticossos contra receptors de folat (Tècnica del "blocking")

Assaig radiomètric per la determinació de la presència d'autoanticossos contra RF i la quantificació de la seva concentració. Els coeficients de variació intra-assaig i de inter-assaig són menors del 6% i del 10%, respectivament.

La concentració de RF purificats que s'afegirà a la mostra, ha de ser coneguda. Per aquesta raó, el primer pas, consistirà en assajar una alíquota de RF de les obtingudes en la purificació de RF i guardades a -20°C . Aquesta alíquota s'ha de descongelar poc a poc submergint-la en gel en escames. Mantenir-la en tot moment en aquestes condicions, agitant amb l'agitador de tubs de tant en tant, fins que es descongeli.

És necessari calcular el volum mínim requerit per assajar el número total de mostres que es programa en una jornada de treball (50 μL de RF/mostra). Al volum mínim requerit s'afegirà un volum extra de marge (volum total final). L'alíquota de RF purificats descongelada s'ha de diluir, el volum total final serà el calculat anteriorment. Per fer aquesta dilució utilitzar tampó base (**Protocol 14**). Es recomana fer primer una dilució (dilució-1) de menor magnitud (per exemple 1:100) i a partir

d'aquesta una segona (dilució-2) (per exemple 1:1000). Aquesta segona dilució tindrà el volum total final necessari (calculat anteriorment) per assajar el total de mostres. Es preparen aquestes dues dilucions en tubs tipus *Eppendorf* de 2 mL correctament identificats per evitar confusions. Mantenir en tot moment aquestes dilucions en condicions de fred (sobre gel d'escames).

A cadascuna de les mostres a assajar es pretén afegir una quantitat de RF purificats equivalent a entre 10000-15000 CPM (0.34-0.51 pmol RF, respectivament). Per determinar si la dilució-2 contribuirà amb aquesta quantitat de RF dins el rang desitjat, s'assajarà 200 µL d'un control negatiu (plasma/sèrum sense autoanticossos contra RF). En el cas de què s'hagi de diluir, la nova dilució es pot preparar directament de la dilució-2. En el cas de què es desitgi obtenir una dilució més concentrada, aquesta nova dilució-2 es prepararà a partir de la dilució-1, i amb la nova dilució-2 preparada, es tornarà a assajar 200 µL de control negatiu. El procés de l'assaig del control negatiu és el mateix que el que s'exposarà a continuació per les mostres, amb la diferència que el [³H]-APG no s'incubarà tota la nit, sinó 20 minuts a temperatura ambient.

A la **FIGURA 14** hi ha representats els passos a seguir en la preparació de la mostra. A 200 µL de plasma/sèrum dispensats en un tub tipus *Eppendorf* de 2 mL, s'afegeixen 300 µL de tampó àcid-2 (**Protocol 19**), i es barrejarà bé. Aquest tractament àcid, permet que en el cas que a la mostra hi hagi presència de RF, el folat endogen es dissociï del RF de la mateixa manera que els possibles autoanticossos contra RF. Una vegada dissociats, s'ha d'eliminar de la mostra la totalitat del folat endogen. Això s'aconsegueix afegint la barreja a un botó de carboni activat/dextrà al 5% (**Protocol 21**). Resuspendre el botó i homogeneïtzar la barreja amb l'ajuda d'un agitador de tubs. Centrifugar a 15339 x g durant 3 minuts, i recuperar el sobrenedant que es transferirà a un altre tub tipus *Eppendorf* de 2 mL. Neutralitzar la mescla afegint 62 µL de NaPO₄ dibàsic 1M (**Protocol 11**).

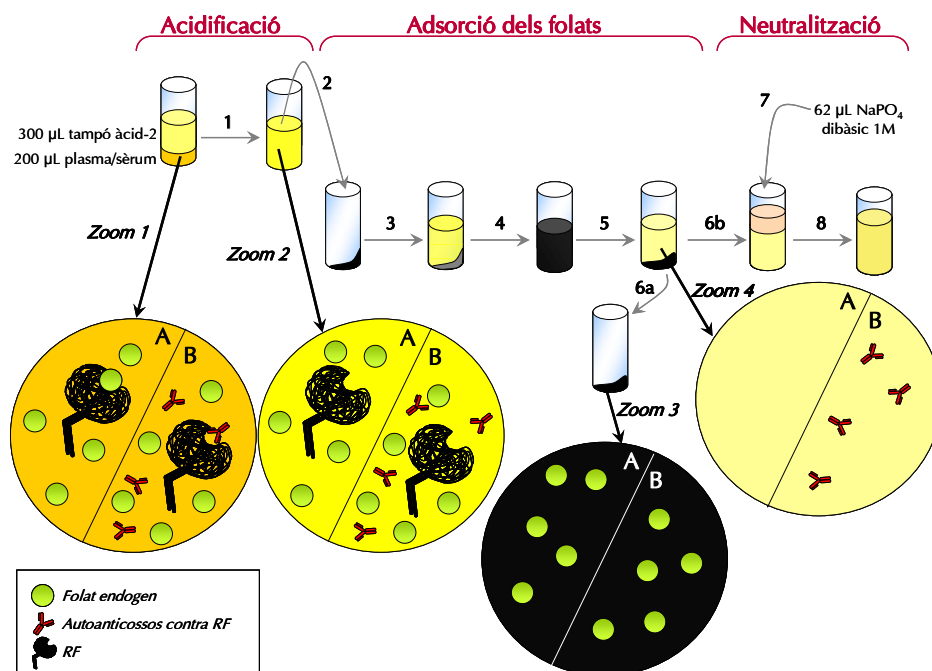


FIGURA 14. Preparació de la mostra per la tècnica del *blocking*

(1: barrejar bé 300 µL de tampó àcid-2 i 200 µL de plasma/sèrum, **Zoom 1**: al sèrum/plasma humà poden donar-se dues situacions: absència d'autoanticossos contra RF (receptors de folat) (A), presència d'autoanticossos contra RF (B). Tant en la situació A com en la B el sèrum/plasma conté folat endogen lliure, o unit a RF lliures, **Zoom 2**: el tractament àcid afavoreix la dissociació del folat endogen (A) i dels autoanticossos (B) dels RF, 2, 3: transferir la mescla de tampó àcid i sèrum/plasma a un botó de carboni activat/destrà al 5%, 4: resuspensió del botó i homogeneïtzar la barreja amb l'ajuda d'un agitador de tubs, 5: centrifugar 3 minuts a 15339xg, 6a: descartar el precipitat de carboni activat/destrà, **Zoom 3**: al precipitat, quedarà retingut tot el folat, **Zoom 4**: el sobrenedant quedarà lliure de folat en les mostres negatives per autoanticossos contra RF (A) i lliures de folat i d'autoanticossos contra RF les mostres positives per aquests autoanticossos (B); tant en un cas com en l'altre també hi restaran els RF solubles que contenia la mostra; però aquests últims són presents en un percentatge molt baix, raó per la que no s'han inclòs en el diagrama, 6b: transferir el sobrenedant a un tub tipus Eppendorf, 7: neutralitzar el sobrenedant obtingut afegint 62 µL de NaPO₄ dibàsic 1M, 8: barrejar bé)

En aquest punt, la mostra està lliure de folats, però segueix contenint els possibles autoanticossos contra RF. La mostra ja està preparada per assajar-la. A la FIGURA 15 es resumeix de forma gràfica els últims passos de la tècnica del detecció d'autoanticossos contra RF. S'afegeixen 50 µL de la dilució-2 de RF i s'incuba la

barreja tota la nit a 4°C. En el cas de la presència d'autoanticossos contra RF, aquests s'uniran als RF que s'han afegit, concretament a la regió específica on s'uneix el folat.

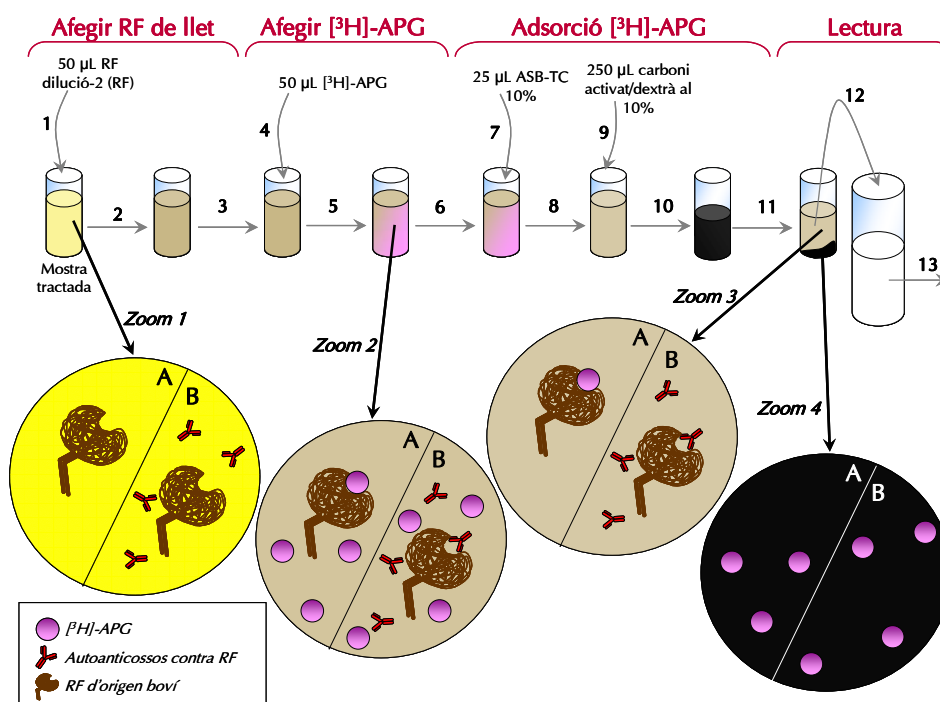


FIGURA 15. Tècnica del *blocking*

(1: afegeir 50 µL de la diluïció-2 de RF (receptors de folat) a la mostra tractada prèviament, **Zoom 1**: en el cas d'una mostra tractada negativa per autoanticossos contra RF només (A) i en el cas d'una mostra tractada positiva per aquests autoanticossos (B), ara s'afegeix una concentració coneguda de RF d'origen boví, 2: barrejar bé, 3: incubar tota la nit a 4°C, 4: afegeir el dia següent, 50 µL de àcid pteroilglutàmic marcat amb l'isòtop estable trító (^3H)-APG), 5: barrejar, **Zoom 2**: en absència d'autoanticossos contra RF, el ^3H -APG s'unirà al lloc específic d'unió del RF boví (A), acció interferida en el cas de la presència d'autoanticossos blocats del RF (B), 6: incubar 20 minuts a temperatura ambient, 7: afegeir 25 µL d'albumina sèrica bovina tractada amb carboni activat (ASB-TC) al 10%, 8: barrejar, 9: afegeir 250 µL de carboni activat/dextrà al 10%, 10: barrejar homogèniament, 11: centrifugar la mescla a 15339xg durant 3-4 minuts, **Zoom 3**: el sobrenedant quedarà net de ^3H -APG lliure, amb els RF units a ^3H -APG (A) o als autoanticossos contra RF (B), **Zoom 4**: el carboni activat adsorbirà el ^3H -APG que no s'hagi pogut unir als RF d'origen boví, 12: transferir el sobrenedant a 15 mL de "scintillation fluid", 13: barrejar bé i llegir la radioactivitat emesa pel ^3H -APG per minut).

El dia següent, s'afegeixen 50 µL de [³H]-APG i s'incuba 20 minuts a temperatura ambient. El [³H]-APG s'unirà als RF afegits a la mostra. En el cas de la presència d'autoanticossos contra RF, aquests blocaran la unió del [³H]-APG al RF, quedant el [³H]-APG lliure en la mostra. No interessa tenir un excés de [³H]-APG a la mostra, sinó que només hi hagi el que s'ha unit als RF. Per això, cal eliminar el sobrant. Per tal de protegir els RF, s'afegeixen 25 µL de ASB-TC al 10% (**Protocol 15**) i homogeneïtza bé. Per una qüestió de probabilitat, si s'afegeix unes 1000 vegades més quantitat de ASB-TC, el carboni activat abans adsorbirà a la ASB-TC al 10% que als RF. Finalment, s'afegeixen 250 µL de carboni activat/dextrà al 10% (**Protocol 17**) i s'homogeneïtza amb un agitador de tubs. Seguidament es centrifuga la mostra a 15339 x g durant 3-4 minuts per acabar recuperant el sobrenedant i transferir-lo a 15 mL de *scintillation fluid* (MP Biochemicals, Irvine, CA, USA) en un vial de lectura (VWR, West Chester, PA, USA) i barrejar bé. Tal com es feia amb les alíquotes assajades en el procés de purificació de RF, es llegeix la radioactivitat emesa pel [³H]-PGA/minut (CPM) amb l'analitzador *TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer Model 1900CA* (Packard Instrument Company, Downers Grove, IL, USA).

És imprescindible incloure en una tanda de mostres un control negatiu (absència d'autoanticossos contra RF) i un control positiu (presència d'autoanticossos contra RF). El control negatiu, proporciona el valor de referència per quantificar els pmol RF blocat/mL de mostra assajada, i el control positiu, té la funció de verificar que la tècnica està ben realitzada. La **TAULA 5** és un exemple dels resultats obtinguts en l'assaig de 14 mostres. Per comoditat a l'hora de preparar i portar a terme la tècnica del *blocking*, s'han assajat tandes de 14 mostres.

Els estudis PreC i NUTCIR, representen col·leccions de diferents mostres recollides de forma longitudinal, entre les participants. S'han assajat totes les mostres procedents d'una mateixa participant sempre dins una mateixa tanda. Com s'ha indicat anteriorment, a cada tanda s'inclou un control negatiu, i un control positiu entre totes les tandes de la jornada. El valor del control negatiu ha de tenir un valor entre 10000-15000 CPM, i tal com es pot comprovar a la **TAULA 5**, el control positiu un valor molt inferior. Primer es calcula la diferència entre els CPM del control

negatiu i el de cada mostra. A partir d'aquesta diferència es calculen els pg de [³H]-APG blocats. En aquest cas el [³H]-APG que s'ha utilitzat en l'assaig de les mostres tenia una equivalència de 1pg [³H]-APG = 125 CPM.

TAULA 5. Resultats obtinguts en la tècnica del *blocking* en 14 mostres.

ID	CPM	Diferència	pg APG bl.	pmol APG bl. / 200 µL	pmol APG bl. / mL
1	13520	660	5.28	0.01	0.06
2	13777	403	3.22	0.01	0.04
3	13618	562	4.50	0.01	0.05
4	14014	166	1.33	0.00	0.02
5	13761	419	3.35	0.01	0.04
6	13950	230	1.84	0.00	0.02
7	13145	1035	8.28	0.02	0.09
8	13842	338	2.70	0.01	0.03
9	12812	1368	10.94	0.02	0.12
10	8672	5508	44.06	0.10	0.50*
11	7662	6518	52.14	0.12	0.59*
12	13849	331	2.65	0.01	0.03
13	14245	-65	-0.52	0.00	-0.01
14	14311	-131	-1.05	0.00	-0.01
POS	4650	9530	76.24	0.17	0.86
NEG	14180	-	-	-	-

ID: identificació de la mostra, *CPM*: emissions per minut, *pg APG bl.*: pgr d'àcid pteroilglutàmic marcat amb l'isòtop estable trító blocats, *pmol APG bl. / 200µL*: pmol [³H]-APG blocat en els 200 µL de mostra assajada, *pmol APG bl. / mL*: pmol [³H]-APG blocat/mL de mostra, *POS*: control positiu, *NEG*: control negatiu, *resultat positiu per autoanticossos contra RF

Es calcula a partir dels pg [³H]-APG blocat, els pmol [³H]-APG blocat en els 200 µL de mostra assajada en base al pes molecular del [³H]-APG ≈ 125 pg/pmol. El resultat, es converteix en pmol [³H]-APG blocat/mL, multiplicant per 5. El [³H]-PGA s'uneix al

RF en una proporció 1:1, per tant el resultat de pmol [³H]-APG blocat/mL és el mateix que pmol RF blocat/mL de mostra assajada.

Es considera que una mostra presenta autoanticossos contra RF, quan el valor és igual o superior a 0.2 pmol RF blocat/mL. Aquest valor correspon al 5% d'error acceptat. Aquest marge d'error correspondria a errors comesos en els procediments de pipeteig de la tècnica. Abans de procedir a l'assaig de les mostres en qüestió, el responsable de realitzar aquesta tècnica, s'haurà d'assegurar que no supera aquest 5%.

Una limitació molt important de la tècnica del *blocking*, és l'hemòlisi de les mostres sanguínies. L'hemòlisi de les mostres podria induir a falsos positius. La detecció de les emissions del tritó són interferides pels components alliberats del resultat de la hemolització dels eritròcits.

5. Assaig de detecció d'autoanticossos d'unió de receptors de folat (Tècnica del "binding")

Tècnica per determinar la presència d'autoanticossos d'unió RF. Aquests autoanticossos s'unirien a qualsevol part de la superfície del RF, inclòs el lloc específic d'unió del folat. Tècnica portada a terme mitjançant un immunoassaig ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) colorimètric. Els coeficients de variació intra- i inter-assaigs són menors del 10%. Consta de 3 passos:

PAS 1: Tractament de la mostra

De forma similar a com es fa en la tècnica de *blocking*, la mostra (plasma/sèrum) ha de ser tractada per tal d'eliminar el folat endogen que contingui. Aquest tractament s'inicia amb l'acidificació de la mostra, afegint 380 µL de tampó àcid-3 (**Protocol 22**) a 20 µL de mostra en un tub tipus *Eppendorf* de 2mL. Aquesta barreja s'afegirà a un botó de carboni activat 5% / dextrà 1% (**Protocol 24**). Resuspendre el botó de carboni activat/dextrà amb l'ajuda d'un agitador de tubs i posteriorment es precipitarà la barreja centrifugant la mostra a 15339 x g durant 5 minuts. Per afavorir posteriorment la recuperació del sobrenedant, es col·loquen els tubs a la centrífuga amb l'obertura

del tap el més allunyat possible del centre del rotor. Per tal de compactar més el precipitat, girar els tubs 180 graus (obertura del tap del tub el més a prop possible del centre del rotor), i tornar a centrifugar sota les mateixes condicions. Seguidament es transfereix el sobrenedant, on quedaran els autoanticossos en el cas que n'hi hagi a la mostra, a un altre tub tipus *Eppendorf* de 2 mL i, es neutralitzarà el pH de la mostra afegint 60 μL de NaPO_4 dibàsic 1M (**Protocol 11**). Finalment, s'homogeneïtza la barreja amb l'ajuda de l'agitador de tubs i s'augmenta el volum total afegint 40 μL de tampó fosfat-EDTA (**Protocol 26**). La mostra estarà preparada per tal de poder ser assajada. Fins aleshores la mostra tractada es pot mantenir congelada a -20°C . A partir d'ara, en farà referència a la mostra, com "mostra tractada". D'aquesta mostra tractada, s'assajaran 25 μL , que en realitat representen 1 μL de mostra (plasma/sèrum inicial).

PAS 2: Revestiment dels pous d'ELISA amb receptors de folat purificats

S'han de preparar les plaques d'ELISA (*Reacti-BindTM Amine-binding, maleic anhydride 96-well plates, Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL, USA*) que s'utilitzaran per l'assaig. Aquestes plaques es caracteritzen per permetre la immobilització de pèptids i altres lligands que continguin una amina primària. En aquest cas concret, seran els RF purificats a partir de llet bovina. El fons dels 96 pous d'aquest tipus de plaques, està revestit d'anhidrid maleic, al qual s'hi unirà el RF que conté una amina primària. Aquesta unió és estable a pH neutre o superior (**FIGURA 16**).

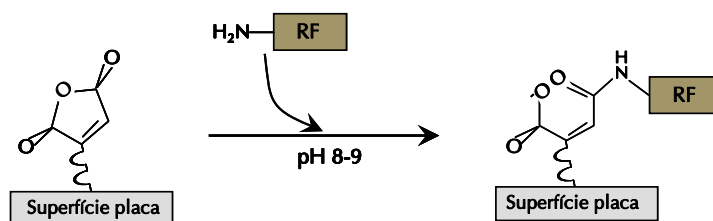


FIGURA 16. Reacció d'unidó del receptor de folat a la superfície dels pous de la placa d'ELISA.

La FIGURA 17 es representa esquemàticament un pou de la placa d'ELISA, amb els passos a seguir. A cadascun dels 96 pous de la placa, s'afegeixen 100 μL de RF purificats a una concentració de 10-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; diluïts amb tampó fosfat-1 (**Protocol 1**).

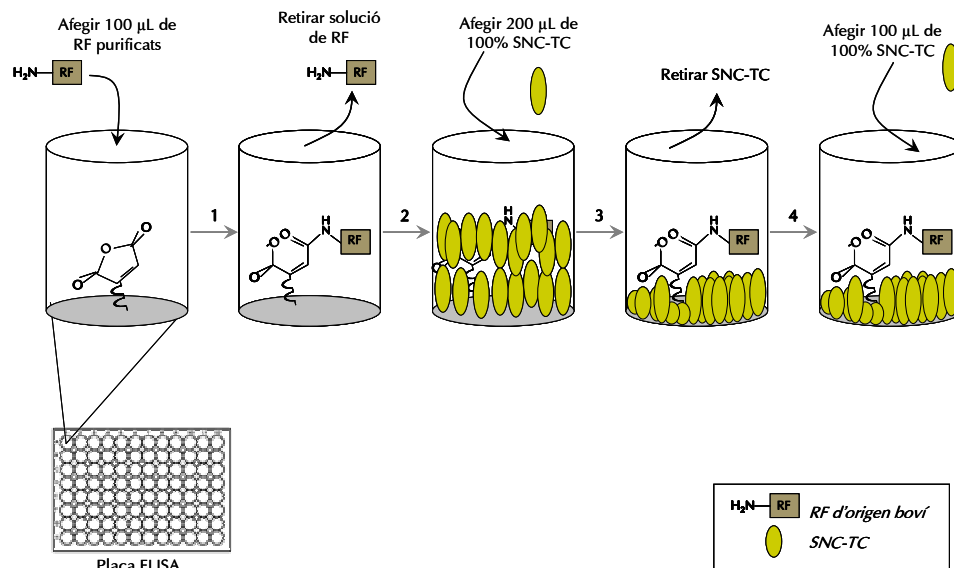


FIGURA 17. Revestiment dels pous de la placa d'ELISA.

(RF: receptor de folat; 1: Incubació dues hores a temperatura ambient; 2: Rentat amb 200 μL de tampó fosfat-3; SNC-TC: sèrum normal de conill tractat amb carboni activat; 3: Incubació tota la nit a 4°C; 4: Tres rentats amb tampó fosfat-3).

Es deixa incubar durant un mínim de 2 hores a temperatura ambient. En tot moment al llarg de l'assaig s'ha d'evitar l'evaporació del contingut dels pous de la placa. Això s'aconsegueix mantenint durant els temps de incubacions les plaques dins una bossa amb tancament procurant d'eliminar el màxim aire possible del seu interior. Transcorregut aquest temps, es recupera la solució de RF sobrant que no s'ha lligat al anhidrid maleic. Aquesta solució de RF es pot reciclar per revestir els pous d'altres plaques d'ELISA evitant la seva congelació. Rentar els pous, afegint 200 μL de tampó fosfat-3 (**Protocol 27**). En aquest punt, a cadascuna de les molècules d'anhidrid

maleic que revesteixen els pous de la placa s'hi ha unit un RF per l'amina primària d'aquest. Però al fons dels pous resten espais de la superfície lliures. Per evitar unions inespecífiques posteriorment, s'ha de reduir al màxim aquests espais lliures. Això es fa bloquejant aquests espais amb la unió de les proteïnes que conté el sèrum normal de conill tractat amb carboni activat (SNC-TC) (**Protocol 28**). Es pot utilitzar un sèrum d'una espècie diferent de la de conill, sempre i quan no sigui d'origen humà. L'objectiu és per una banda omplir els buits que queden al fons de la placa i per una altra, evitar unions amb els autoanticossos d'unió de RF. Aquest sèrum normal de conill, ha estat tractat amb carboni activat per eliminar el folat endogen i així, evitar la possibilitat que aquest folat es pugui unir als RF immobilitzats al fons de la placa.

A cada pou, afegir 200 μL de SNC-TC, i deixar incubar tota la nit a 4°C dins una bossa amb tancament. El següent pas consistirà en rentar els pous de la placa per tal d'eliminar totes les restes possibles que puguin quedar. Això es fa mitjançant 3 rentats amb 250 μL de tampó fosfat-3 (**Protocol 27**). És molt important que els pous estiguin constantment hidratats, per tant, evitar que aquests romanguin sense tampó molta estona. Més endavant s'explica l'ordre, sentit i direcció en el pipeteig dels diferents pous de la placa d'ELISA, per tal d'evitar errors i controlar en tot moment la identificació de mostra en cada pou.

Finalment, s'afegeixen 75 μL de SNC-TC/pou en el cas que el dia següent es continuï amb el tercer pas de la tècnica. Però si ha de transcórrer més temps, s'afegiran 100 μL . I es guarda la placa a 4°C dins una bossa de plàstic amb tancament. La placa ja estarà preparada per portar a terme la tècnica del *binding* pròpiament dita.

PAS 3: Assaig d'ELISA

Abans d'iniciar l'assaig, hi ha uns previs a tenir en compte. Si al final del pas anterior s'ha guardat la placa amb 100 μL de SNC-TC/pou, el primer pas consistirà en descartar 25 μL de cadascun dels pous. En el cas que hi hagi 75 μL de SNC-TC/pou, no és necessari treure'n. Prèviament s'han de descongelar a temperatura ambient les mostres tractades que s'havien reservat fins aquest moment a -20°C. A la **FIGURA 18**, es representa en forma d'esquema els passos a seguir en l'assaig d'ELISA i el que

molecularment succeeix en el cas de què la mostra contingui o no autoanticossos d'unió de RF.

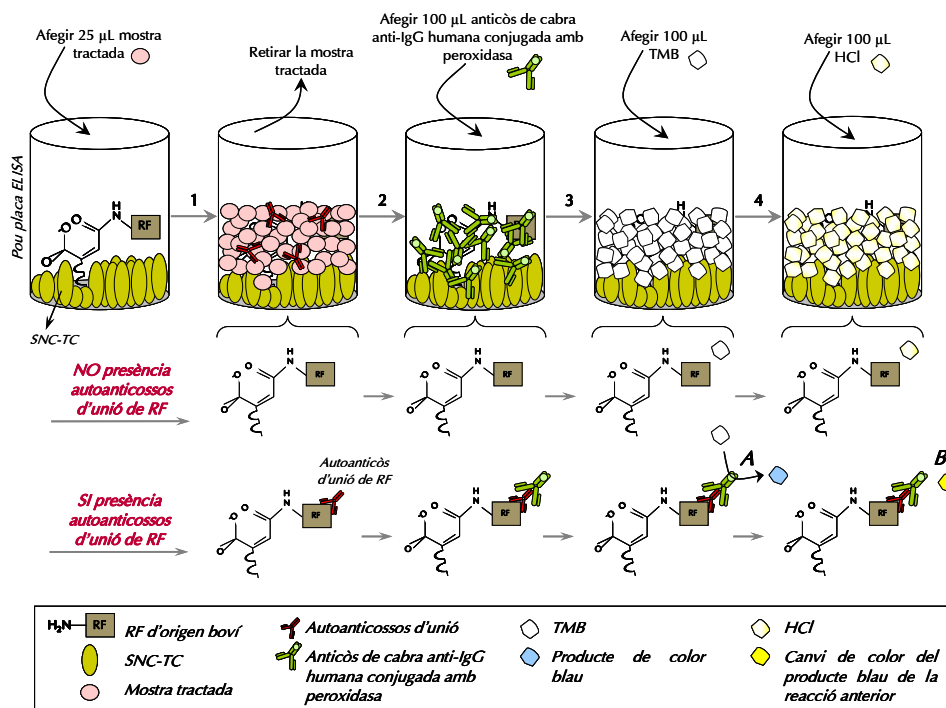


FIGURA 18. Tècnica del *binding*.

(1: Incubació tota la nit a 4°C, 2: Quatre rentats amb 250 µL de tampó de rentat, 3: Incubar una hora a temperatura ambient i fer quatre rentats amb 250 µL per pou de tampó rentat, A: reacció del TMB amb la peroxidasa, el resultat és l'aparició d'un producte de color blau, 4: Incubar 10 minuts a temperatura ambient, B: El HCl para la reacció del TMB, el resultat és el canvi de color del producte de color blau a groc).

A cada pou cal afegir 25 µL de mostra tractada i incubar tota la nit a 4°C dins una bossa de plàstic amb tancament. El dia següent, retirar tot el contingut dels pous. En el cas que la mostra contingui autoanticossos d'unió de RF, aquests s'uniran al RF que s'ha immobilitzat a través de l'anhidrid maleic. Seguidament, es rentaran tots els pous 4 vegades amb 250 µL de tampó de rentat (Protocol 29), per eliminar qualsevol

resta de mostra tractada. El tampó de rentat, conté Tween 20 (*Tween®-20: Surfact-AMps® 20 Purified Detergent Solution. Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL, USA*), un detergent que elimina les unions específiques.

Cal incubar 100 µL per pou d'un anticòs de cabra anti-IgG humana conjugat amb peroxidasa (*#PI-3000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*) diluït 1:6000 amb SNC-TC, durant 1 hora a temperatura ambient. Aquest anticòs de cabra s'unirà als possibles autoanticossos d'unió de RF que hi hagi. Transcorregut aquest temps, es torna a rentar els pous 4 vegades amb 250 µL/pou amb tampó de rentat (**Protocol 29**).

En aquest punt l'anticòs de cabra estarà unit específicament a l'anticòs humà present a la mostra de plasma/sèrum. Aquest anticòs de cabra anti-Ig humana té conjugat l'enzim peroxidasa. En aquest cas concret és la peroxidasa de rave, la qual té moltes aplicacions en les tècniques immunoquímiques, per les seves característiques d'alta estabilitat, de fàcil conjugació a les immunoglobulines i per la senzillesa de la seva detecció mitjançant mètodes colorimètrics. En aquest últim aspecte es basa el següent pas, ja que aquesta peroxidasa reaccionarà amb els 100 µL de TMB (*3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*) (*1-Step™ Ultra TMB-ELISA, Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL, USA*) soluble que s'afegirà a cada pou. Al reaccionar el TMB amb la peroxidasa, es produeix un producte de color blau. En el transcurs dels 10 minuts que es deixarà reaccionar el TMB, el color del contingut dels pous virarà d'incolòr a blau (**FIGURA 19**). Transcorregut aquest temps es para aquesta reacció afegint 100 µL/pou de HCl 1M (*J. T. Baker Phillipsburg, NJ, USA*) el qual canvia el color del producte blau a color groc (**FIGURA 20**). Aquest s'absorbeix a una longitud d'ona de 450 nm i proporciona major sensibilitat de lectura que el producte blau. Per mesurar l'absorbància de cada pou a aquesta longitud d'ona s'utilitza un lector de plaques d'*ELISA Bio-Rad Model 3550 Plate Reader (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)*. El HCl que s'ha afegit té una concentració molt alta (1M), de manera que si es deixa reaccionar molt de temps acabarà eliminant la immobilització inicial dels RF amb l'anhidrid maleic, cosa que s'ha d'evitar, per poder reutilitzar la mateixa placa fins un total de 3 assaigs. Per aquesta raó, una vegada l'espectrofotòmetre hagi proporcionat els resultats d'absorbància, és necessari retirar el més aviat possible tot

el contingut dels pous de la placa i neutralitzar el pH, afegint 250 μ L de tampó de rentat (**Protocol 29**).

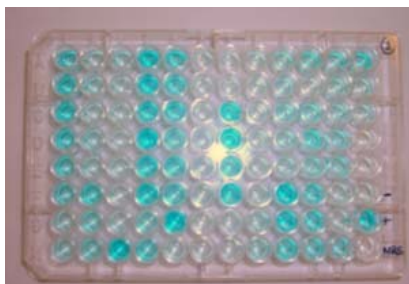


FIGURA 19. Reacció del *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*.



FIGURA 20. Reacció de l'àcid clorhídric.

Transcorreguts uns minuts s'elimina el tampó de rentat i s'afegeixen 100 μ L/pou de SNC-TC. La placa es guarda a 4°C dins una bossa de plàstic tancada.

Per tal d'evitar confusions i errors es recomana establir un ordre de treballar en totes les plaques (**FIGURA 21**). S'haurà de treballar amb la placa en una posició concreta – numeració a la part superior i abecedari al costat esquerra – i sempre pipetejar els volums en una direcció i sentit concret – de dalt (començant pel pou A1) a baix (A2,

A3, ...) i d'esquerra (començant per la columna 1) a dreta (columna 2, columna 3, ...); sempre i quan no es treballi amb una micropipeta multicanal. En aquest últim cas, la micropipeta multicanal dispensarà el volum al mateix temps als pous de tota una columna, i la direcció de treball serà d'esquerra a dreta (columna 1, columna 2, columna 3, ...). En els punts de la tècnica on s'ha de dispensar en tots els pous de la placa el mateix volum d'una mateixa substància, utilitzar una micropipeta de repetició de volum o una micropipeta multicanal. S'ha de procurar evitar al màxim el contacte de la punta de la micropipeta amb les parets del pou. Per retirar el contingut dels pous, es recomana utilitzar un sistema d'aspiració per buit.

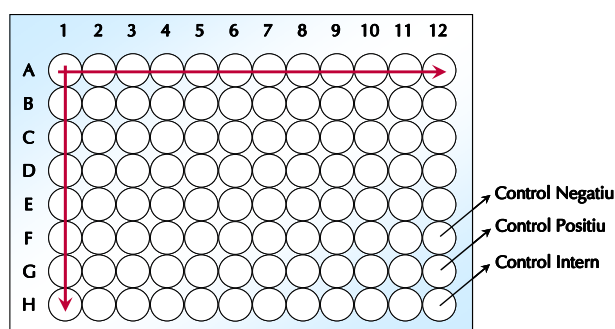


FIGURA 21. Esquema de treball a seguir en l'ús de la placa d'ELISA.

És necessari afegir a cada placa d'ELISA uns controls que proporcionin la informació necessària que confirmi la validesa dels resultats obtinguts. Seran un control positiu, un control negatiu i un control intern, que sempre es col·locaran les posicions concretes dins la placa tal com es representa a la FIGURA 21. A F12, G12 i H12 s'hi dipositarà el control negatiu, el control positiu i el control intern, respectivament. Aquests tres pous, es tractaran seguint l'ordre de treball descrit anteriorment. Es diferencia la mostra a assajar i la interpretació que se n'ha de fer en cadascun:

Control negatiu: plasma/sèrum humà que no conté autoanticossos d'unió de RF. Es podria pensar que com es tracta de plasma/sèrum que no conté autoanticossos d'unió

de RF, el valor de la lectura, hauria de ser gairebé idèntic al control intern. Però això no serà així, doncs aquest control negatiu és d'origen humà i per tant conté IgG d'origen humà; de manera que l'anticòs de cabra anti-IgG detectarà i s'unirà a IgG presents en la mostra, però aquesta serà mínima (**FIGURA 22**). Si la lectura d'aquest pou és alta, indica que hi hagut contaminació, que els rentats no han estat ben realitzats.

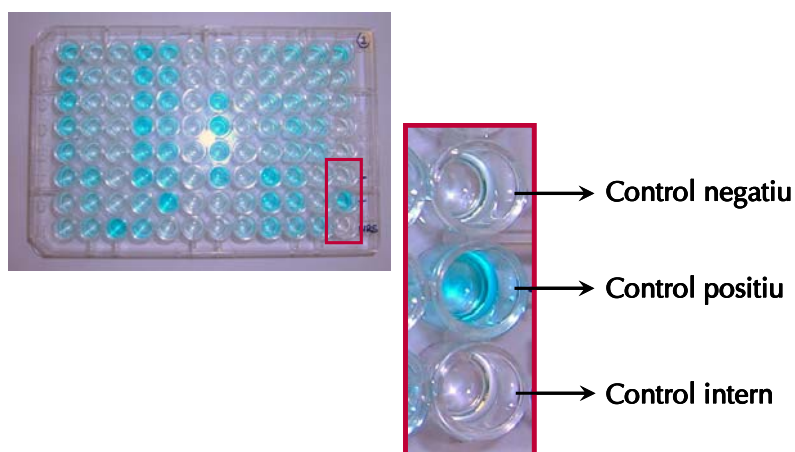


FIGURA 22. Reacció del *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine* en els diferents controls.

Control positiu: assaig d'un plasma/sèrum d'origen humà que conté autoanticossos d'unió de RF. La lectura serà positiva (**FIGURA 22**). Indica si l'anti-IgG humana de cabra és funcional i per tant capaç de detectar la presència d'autoanticossos d'unió de RF en la resta de pous.

Control intern: enlloc de mostra s'assaja SNC-TC (el mateix que s'ha utilitzat en la resta de passos). Resulta imprescindible, ja que informa de la validesa del procés. Quant més baixa sigui la seva lectura, millor s'han realitzat els rentats en tota la placa (**FIGURA 22**). No existeix especificitat de reacció immunològica entre les possibles IgG que continguin el SNC-TC i l'anti-IgG humana de cabra, per tant, un resultat positiu indicarà contaminació inter-pous.

6. Discussió

Des del 2004 que es va descriure per primera vegada la tècnica del *blocking*,²⁰⁹ s'han introduït diverses modificacions amb l'objectiu de millorar el rendiment de processament de mostres. Resten encara però, moltes qüestions per resoldre.

L'efecte de la presència d'autoanticossos blocants dels RF, implicaria l'alteració del transport de folats cap a la cèl·lula per aquesta via de transport. El resultat variaria segons la dependència de la cèl·lula per aquesta via de transport, però podria causar un dèficit intracel·lular en folats, i com a conseqüència la integritat de la cèl·lula comprometida. Aquesta situació és possible detectar-se a través de la tècnica del *blocking*. Per contra, la tècnica del *binding*, permet detectar autoanticossos capaços d'unir-se a qualsevol regió de la superfície del RF inclosa l'específica d'unió a folats. Resulta difícil interpretar el resultat de la tècnica del *binding*, en quant a la possible conseqüència biològica que pot representar. Si els autoanticossos units a qualsevol part del RF no bloquegen el lloc d'unió del folat, l'efecte sobre el transport de folat no seria el mateix que en el cas del bloqueig. No obstant, la presència d'autoanticossos units a qualsevol altra part del receptor podria afectar la funcionalitat del receptor.

Una de les qüestions que es plantegen, és saber si els autoanticossos que s'uneixen a qualsevol àrea del RF, però no al lloc específic del folat, poden tenir una conseqüència biològica important. En aquest cas, *a priori* es pot pensar que la funció de transport de folat en sí mateixa no estaria alterada ja que el folat podria unir-se al lloc específic del RF i probablement no es veuria afectat l'estat cel·lular en folats. Però es desconeix la possible conseqüència biològica que podria representar la seva presència. Hi ha la possibilitat que poguessin interferir en el procés d'endocitosi, o un altre efecte fins ara desconegut. Abans però de poder qüestionar-se la possible conseqüència biològica que se'n pot derivar, és necessari tenir l'eina adequada per poder-los detectar. Actualment, la tècnica del *binding* no discerneix entre els dos tipus d'autoanticossos. La tècnica del *binding* descrita podria ser l'eina de partida per la seva determinació. En aquesta tècnica, els RF amb els que es revesteix el fons de la placa, són lliures de folat (apo-RF). Si aquests RF tinguessin el lloc específic d'unió

del folat ocupat, s'impediria la possible unió d'autoanticossos a aquesta zona. D'aquesta manera, es detectarien només la resta d'autoanticossos d'unió (FIGURA 23).

Cabrera i els seus col·laboradors (2008)²²⁰ descriuen la presència d'autoanticossos pels RF en el sèrum de dones gestants, tant d'un fetus amb algun tipus de DTN (casos) com d'un embaràs sense malformacions (controls). En l'assaig de les mostres sèriques utilitzen RF d'origen boví, tant purificats a partir de llet bovina (seguint la tècnica descrita per Antony i col·laboradors el 1982¹⁵⁹) com de comercialitzats, i també RF purificats a partir de dues placentes humanes. Les mares amb gestació afectada per un DTN, presentaven concentracions d'autoanticossos pels diferents tipus de RF assajats superiors que en el grup control. Aquest treball demostra que depenent de la font de RF utilitzada, el resultat de detecció d'aquests autoanticossos serà variable.

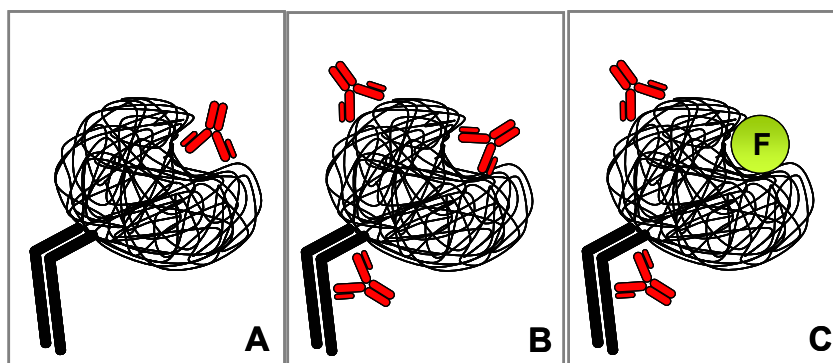


FIGURA 23. Possibles llocs d'unió dels autoanticossos pels receptors de folat.

A. Detecció d'autoanticossos blocants del lloc específic d'unió del folat al receptor de folat (tècnica del blocking), B. barreja d'autoanticossos blocants del lloc específic i d'unió a altres regions de la superfície del RF (tècnica del binding), C. possibilitat de detectar autoanticossos d'unió en qualsevol àrea del receptor de folat però no al lloc específic del folat, ocupat aquest últim prèviament amb àcid fòlic.

La purificació de RF a partir de placenta humana, aporta una barreja de isoformes RF- α i RF- β . Aquest fet recolzaria la hipòtesi de que el RF- β desenvoluparia una funció clau en el desenvolupament gestacional, tot i que la seva afinitat per les formes de

folat fisiològiques és menor respecte el RF- α .^{6,181,187} La presència del RF- β a la placenta, justificaria l'ús de RF purificats a partir de placenta en la determinació d'autoanticossos de RF en relació a complicacions d'embaràs, ja que s'ha de considerar la funció de transport materno-fetal, a través de la placenta. No obstant, no seria adequat utilitzar aquest tipus de receptor en l'estudi de mostres sanguínies procedents del gènere masculí, pel menor índex d'expressió de RF- β en nens/homes. La utilització de dues isoformes de forma conjunta, aporta variabilitat al resultat.²²⁰ Un altre punt a tenir en compte, serà la variabilitat genètica existent entre les donants d'aquestes placentes. Però de la mateixa manera, també existeix aquesta variabilitat entre els diferents animals productors de la llet. A més a més, tot i que el percentatge d'homologia en la seqüència proteica de RF de la llet bovina i d'origen humà supera el 80%,²¹⁶ l'assaig de mostres humanes amb RF d'origen animal aporta el risc de no detectar la totalitat d'autoanticossos presents a la mostra.

Donat la demanda, que segueix augmentant, per les determinacions d'autoanticossos contra RF, la tècnica s'està adaptant per afrontar aquesta demanda. Trobar una font que proporcioni una sola isoforma de RF per permetre reduir la variabilitat de la tècnica, que aquests s'obtinguin en la seva conformació estructural ideal per poder detectar autoanticossos capaços de blocar el transport de folats i per tant assegurar la seva funcionalitat biològica, que permeti incrementar el rendiment de la tècnica i que aquesta es vegi influenciada el mínim possible pel factor humà, és una tasca en vies de resoldre's. Els dissenys de tots els treballs publicats fins la data, han contemplat un volum de mostres relativament petit. Aquest no és el cas del nostre treball, en què s'han assajat 1971 mostres. Els RF purificats a partir de llet de vaca ha estat una de les solucions. Aquests RF s'obtenen en la seva configuració biològica i són 100% funcionals. Això resulta imprescindible per poder interpretar el significat biològic de les concentracions d'autoanticossos detectats. Per altra banda permeten incrementar el rendiment de treball.

Un total de 1971 mostres van ser enviades a SUNY-Downstate Medical Center. D'aquestes, 787 provenen de l'Estudi Poblacional, 198 de l'Estudi PreC i 986 de l'Estudi NUTCIR. S'han aplicat les tècniques del *blocking* a totes les mostres, perquè

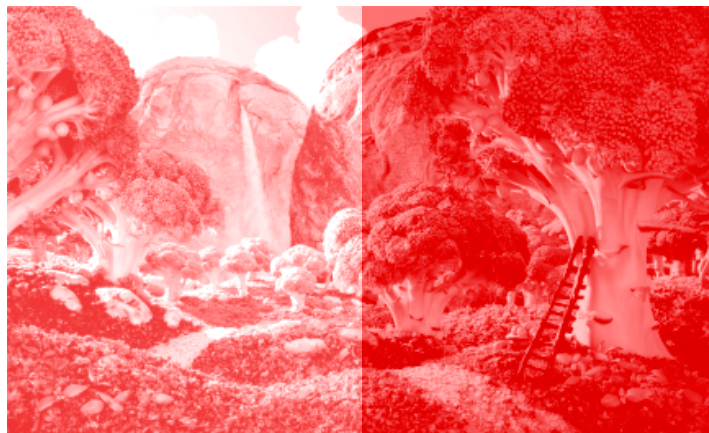
la tècnica del *binding* no permet quantificar la concentració d'autoanticossos capaços d'unir-se al RF. La millora d'aquesta tècnica està en procés de desenvolupament.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009



CAPÍTOL 2

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT A LA POBLACIÓ GENERAL

*J Nutr 2009;139 Mar 12
doi:10.3945/jn.108.102475*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

CAPÍTOL 2

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT A LA POBLACIÓ GENERAL

1. Introducció

L'estat en folats és vital per la integritat cel·lular.²⁴⁰ La deficiència en folats porta a errors en la síntesi⁷⁵ i la metilació⁷³ de l'ADN, i a elevar les concentracions de tHcy.²⁴¹ Concentracions elevades en tHcy han estat associades amb diferents patologies, com els DTN,²⁴² altres complicacions de l'embaràs,⁶⁷ malaltia cardiovascular,⁶⁵ Alzheimer,²⁴³ esquizofrènia i depressió,²⁴⁴ risc de fractures osteoporòtiques²⁴⁵ i càncer.⁶⁸

La biodisponibilitat cel·lular del folat depèn de la font, les reserves i el transport dels folats. Una alteració en aquest últim per la presència d'autoanticossos blocants del RF, pot veure's traduïda en un desequilibri en l'estat en folats. La inhabilitació del RF per la presència d'autoanticossos contra RF en certes etapes de la vida (embaràs, desenvolupament del sistema nerviós central), i en llocs concrets de l'organisme (placenta, plexe coroïdal), en què els requeriments en folats són especialment elevats, s'ha associat amb complicacions de l'embaràs.^{209,211,212,220} i en malalties neurodegeneratives infantils.^{204,204,215,218,216,247}

Hi ha hagut diferents hipòtesis sobre el mecanisme de generació d'autoanticossos contra RF. Al 2004, es proposava que epítops generats a partir d'una lesió de teixits reproductius podrien desencadenar la seva generació.²⁰⁹ També s'ha proposat que un excés de tHcy potenciaria la formació de HTL,²⁴⁸ la qual afegiria residus de Hcy a diferents proteïnes (N-homocisteïnilització), activant-se el sistema immunitari.²⁴⁹ La N-homocisteïnilització de RF, afavoriria la formació d'autoanticossos pels RF.²²¹ Més recentment, segons Ramaekers i els seus col·laboradors, la repetida exposició al tracte digestiu de RF de la llet d'origen boví, seria el responsable de la generació d'aquests autoanticossos.²⁰⁵

Fins la data s'ha investigat la relació amb el desenvolupament neurològic del fetus i en nens. No s'ha explorat la prevalença d'autoanticossos contra RF a la població general, ni el possible efecte que poden tenir aquests sobre l'estat nutricional en folats.

2. Hipòtesi i Objectius particulars

La presència d'autoanticossos contra RF podria perjudicar el transport folats i afectar l'estat en folats a la població.

Els objectius particulars plantejats en aquest capítol són:

- Determinar la prevalença d'autoanticossos contra RF en una mostra representativa seleccionada a l'atzar d'una població espanyola.
- Investigar l'associació entre la presència d'autoanticossos contra RF i l'estat nutricional en folats a la població.
- Investigar l'associació entre el consum habitual de llet i la presència d'autoanticossos contra RF.

3. Disseny de l'estudi

Els participants que conformen aquest estudi provenen de l'Estudi Poblacional. Dels 812 individus reclutats, es disposava de suficient mostra per la determinació d'autoanticossos per RF en 787. La selecció de participants i les dades relacionades es resumeix a la **FIGURA 24**.

La població estudiada es caracteritza per haver estat mínimament exposada a profilaxis amb àcid fòlic. A Espanya no és obligatori la fortificació de la farina amb àcid fòlic. I a diferència d'altres països industrialitzats, el consum de cereals d'esmorzar fortificats amb àcid fòlic és relativament baix entre la població adulta espanyola.¹³²

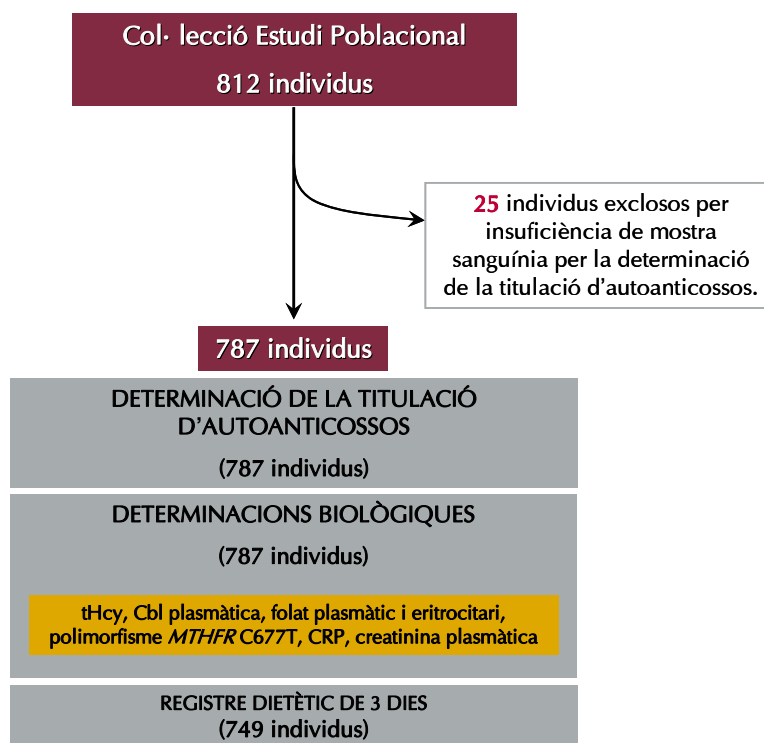


FIGURA 24. Diagrama de selecció de individus de l'Estudi Poblacional i dades utilidades.

(*tHcy*: homocisteïna total plasmàtica en dejú, *Cbl*: cobalamina, *CRP*: proteïna C-reactiva. A l'apartat de Material i Metodologia s'han exposat les tècniques utilitzades per les diferents determinacions bioquímiques)

4. Anàlisi estadística

Els resultats de les variables quantitatives s'expressen com a mitjana i DE. La freqüència de gènere, de la variant TT del polimorfisme 677C→T *MTHFR*, de l'hàbit tabàquic, del consum d'alcohol, de la presència d'inflamació activa (CRP \geq 10 mg/mL), de l'ús de suplementes de vitamines B, del consum de cereals d'esmorzar i de consumidors del llet al quintil més alt (variables dicotòmiques), entre els portadors d'autoanticossos contra RF i els no portadors, van ser comparades utilitzant la prova de la Ji-quadrat. La mitjana de l'edat, l'índex de massa corporal (IMC), la Cbl plasmàtica, el folat plasmàtic i eritrocitari, la tHcy i, la ingesta de llet i de productes làctics van ser comparades entre portadors i no portadors d'autoanticossos contra RF

mitjançant l'anàlisi de la varianza (ANOVA). Les variables que no seguien una distribució normal (en concret la tHcy) van ser log-transformades per tal de poder aplicar proves estadístiques paramètriques.

Per investigar si el bloqueig del transport de folat al RF per autoanticossos contra RF interfereix amb el metabolisme dels folats, s'ha utilitzat l'anàlisi de regressió lineal múltiple. Tots els models van ser ajustats per factors confusors de l'associació entre folat plasmàtic i tHcy (gènere, edat, creatinina plasmàtica, Cbl plasmàtica i genotip 677TT *MTHFR*). Es va partir de la hipòtesi que la tHcy (biomarcador d'estat en folats) podria estar afectada en el cas que els autoanticossos blocants de RF estiguessin impeding el transport de folat. Es va verificar aquesta hipòtesi en diferents models de regressió. Tots els models van ser ajustats per factors confusors coneguts de l'associació entre folat plasmàtic i tHcy. Els models són:

Model global. Estudi de l'existència d'interacció significativa entre folat plasmàtic i titulació d'autoanticossos, en la seva relació amb els nivells de tHcy. Anàlisi de tota la població.

Variable dependent: tHcy.

Variables independents: folat plasmàtic, titulació d'autoanticossos contra RF, terme d'interacció entre folat plasmàtic i titulació d'autoanticossos contra RF [(folat plasmàtic) x (titulació d'autoanticossos)]

Ajustat per les variables confusores: Cbl plasmàtica, genotip 677TT *MTHFR*, creatinina plasmàtica, gènere i edat.

Com la interacció entre folat plasmàtic i titulació d'autoanticossos contra RF era significativa, aquestes dues variables no podien interpretar-se de forma independent. Per aquesta raó es van dissenyar diferents models:

Model 1. Estudi de l'associació entre folat plasmàtic i tHcy en absència d'autoanticossos contra RF.

Variable dependent: tHcy.

Variable independent: folat plasmàtic

Ajustat per les variables confusores: Cbl plasmàtica, genotip 677TT *MTHFR*, creatinina plasmàtica, gènere i edat.

Model 2. Estudi de l'associació entre folat plasmàtic i tHcy en presència d'autoanticossos contra RF.

Variable dependent: tHcy.

Variable independent: folat plasmàtic

Ajustat per les variables confusores: Cbl plasmàtica, genotip 677TT *MTHFR*, creatinina plasmàtica, gènere i edat.

Model 3. Estudi de l'associació entre la titulació d'autoanticossos contra RF i tHcy.

Variable dependent: tHcy.

Variable independent: titulació d'autoanticossos contra RF

Ajustat per les variables confusores: Cbl plasmàtica, genotip 677TT *MTHFR*, creatinina plasmàtica, gènere i edat.

Amb l'anàlisi de regressió logística múltiple es va determinar el risc [odds ratio (OR)] de tenir autoanticossos contra RF entre els consumidors en cada quintil de consum de llet comparat amb el quintil més baix. I també es va determinar la OR de tenir autoanticossos contra RF al quintil més alt de consum de llet comparat amb la resta de la població. Els models de regressió logística múltiple a part de ser ajustats per edat i gènere, també es van ajustar per altres factors confusors potencialment importants per la producció d'autoanticossos contra RF. Les infeccions agudes comunes inevitablement presents a diferents fases en una mostra poblacional d'edats variables recollides al llarg de l'any pot haver afectat temporalment la integritat gastrointestinal. Per aquesta raó es van ajustar els models de regressió logística múltiple per concentració de CRP ≥ 10 mg/mL (indicatiu de la presència d'inflamació activa) respecte una concentració de CRP < 10 mg/mL. La N-homocisteïnització de residus de lisina en presència de HTL, associada amb tHcy alta podria desencadenar la producció d'autoanticossos contra RF.²²¹ Vam ajustar per tenir tHcy alta [$\geq P_{90}$ (tHcy $\geq 13.8\mu\text{mol/L}$)] respecte la resta de la població. El nivell de significació utilitzat és de $p < 0.05$.

5. Resultats

La prevalença d'individus portadors d'autoanticossos contra RF en la població estudiada és d'un 7.2%, amb una titulació mitjana (DE) de 0.3 (0.27) pmol RF blocat/mL de plasma (entre els portadors). Els hàbits d'estil de vida i dietètics i, l'estat nutricional en folats i vitamines B involucrades en la regulació de la tHcy estan resumides pels portadors i no portadors d'autoanticossos contra RF a la **TAULA 6**.

TAULA 6. Característiques dels hàbits d'estil de vida i dietètics i, estat en vitamines en no portadors i portadors d'autoanticossos contra receptors de folat.

	No portadors	Portadors
N (%)	730 (92.8)	57 (7.2)
Gènere masculí, n (%) [n]	348 (47.7) [730]	30 (52.6) [57]
Edat (anys), mitjana (DE ¹) [n]	42.9 (15.3) [730]	43.1 (15.4) [57]
Genotip 677TT <i>MTHFR</i> , n (%) [n]	123 (17.0) [724]	10 (17.5) [57]
Fumadors, n (%) [n]	249 (34.3) [727]	24 (42.8) [56]
Consumidors d'alcohol, n (%) [n]	303 (42.5) [713]	25 (44.6) [56]
IMC ² (Kg/m ²), mitjana (DE) [n]	26.9 (5.0) [718]	27.2 (5.3) [57]
Cbl ³ plasmàtica (pmol/L) mitjana (DE) [n]	373 (149) [724]	353 (110) [57]
Folat plasmàtic (nmol/L), mitjana (DE) [n]	13.4 (8.3) [725]	13.6 (7.6) [57]
Folat eritrocitari (nmol/L), mitjana (DE) [n]	874 (353) [726]	912 (409) [57]
tHcy ⁴ (µmol/L), mitjana (DE) [n]	10.1 (3.3) [725]	9.8 (2.9) [57]
Titulació ⁵ (pmol RF blocat/mL), mitjana (DE) [n]	0 [730]	0.30 (0.27) [57]
CRP ≥ 10mg/L, n (%) [n]	30 (4.3) [704]	3 (5.8) [52]
Ús de vitamines B, n (%) [n]	13 (1.8) [730]	0 [57]
Consum de cereals d'esmorzar, n (%) [n]	49 (7.1) [692]	6 (10.5) [57]
Ingesta de llet (g/dia), mitjana (DE) [n]	199 (147) [692]	255 (199) [57]**
Ingesta productes làctics (g/dia), mitjana (DE) [n]	102 (80) [692]	88 (82) [57]
Quintil alt d'ingesta de llet, n (%) [n]	133 (19.2) [692]	18 (31.6) [57]*

¹DE: desviació estàndard, ²IMC: índex de massa corporal, ³Cbl: cobalamina, ⁴tHcy: homocisteïna plasmàtica total en dejú, ⁵Titulació: concentració d'autoanticossos contra receptors de folat (pmol RF blocat/mL), *ji-quadrat: més portadors amb ingesta de llet al quintil més alt respecte a no portadors (p<0.05), **ANOVA: més alt en portadors que en no portadors (p<0.01).

La ingesta diària de llet és significativament més alta entre els portadors d'autoanticossos respecte els no portadors (TAULA 6). La proporció de portadors d'autoanticossos contra RF amb consum de llet al quintil més alt (31%) és significativament més elevada que en no portadors (18%), $p < 0.05$ (TAULA 6).

L'anàlisi de regressió lineal múltiple utilitzat per investigar la influència dels autoanticossos contra RF sobre l'associació entre l'estat en folats i la tHcy mostrava que hi havia interacció significativa entre la titulació d'autoanticossos contra RF i el folat plasmàtic en les seves associacions amb la tHcy ($p < 0.01$). Degut a que la relació entre el folat plasmàtic i tHcy depèn de la titulació d'autoanticossos contra RF diferents, aquesta associació es va investigar en models diferents per l'absència i la presència d'autoanticossos contra RF.

En el model en què s'inclouia només els no portadors d'autoanticossos contra RF, hi havia una associació inversa significativa entre folat plasmàtic i tHcy (Model 1, TAULA 7).

En els portadors d'autoanticossos la magnitud de l'associació inversa entre folat plasmàtic i tHcy era almenys la meitat que entre els no portadors, però no era significativa (Model 2, TAULA 7).

L'augment en una unitat de la titulació d'autoanticossos contra RF, s'associa amb un increment en un 22% de tHcy. La prevalença de individus portadors d'autoanticossos en aquesta població és baixa i, la mitjana de titulació és de 0.30 pmol RF blocat/mL de plasma. Com l'increment en 1 pmol RF blocat/mL en aquesta mitjana resulta una magnitud poc probable, es va calcular l'increment de tHcy a partir de 1 DE (0.27 pmol RF blocat/mL) en la titulació d'autoanticossos. L'increment en 1 DE en la titulació d'autoanticossos contra RF, s'associa amb un increment del 5.5% de la tHcy, però sense ser significatiu (Model 3, TAULA 7).

TAULA 7. Resum dels models de regressió lineal múltiple.

Model	Variables independents	% canvi en tHcy ¹	F de Snedecor	R ²
No portadors²	Folat plasmàtic (1 nmol/L)	-0.7***	F _{6,722} = 48.6***	0.28
	Genotip 677TT <i>MTHFR</i>	19.6***		
	Cbl plasmàtica (50 pmol/L)	-2.0***		
Portadors³	Folat plasmàtic (1 nmol/L)	-0.4	F _{6,57} = 3.4**	0.21
	Genotip 677TT <i>MTHFR</i>	17.9		
	Cbl plasmàtica (50 pmol/L)	-3.1*		
Portadors⁴	Increment 1 DE ⁵ en la titulació ⁶	5.5	F _{6,57} = 3.9**	0.24
	Genotip 677TT <i>MTHFR</i>	17.9		
	Cbl plasmàtica (50 pmol/L)	-3.5*		

¹tHcy: homocisteïna plasmàtica total en dejú, ²No portadors d'autoanticossos contra receptors de folat (RF): model ajustat per gènere, edat, cobalamina plasmàtica i creatinina sèrica, ³Portadors d'autoanticossos contra RF: model ajustat per gènere, edat, cobalamina plasmàtica i creatinina sèrica, ⁴Portadors d'autoanticossos contra RF: model ajustat per gènere, edat, cobalamina plasmàtica, creatinina sèrica i titulació d'autoanticossos contra RF, ⁵DE: desviació estàndard, ⁶Titulació: concentració d'autoanticossos contra RF (pmol RF blocat/ml), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

El 90% dels participants que van completar el recordatori dietètic de 3 dies (674 de 749 participants), van afirmar ser consumidors de llet. L'anàlisi de regressió logística múltiple mostrava que el risc de tenir autoanticossos contra RF augmentava amb l'increment del quintil d'ingesta de llet comparat en estar al quintil més baix (FIGURA 25). La OR de ser portador d'autoanticossos contra RF estant al quintil més alt de ingesta de llet (rang: 307-1247 g/d) comparat amb el quintil més baix (rang: 0-67 g/d) era de 2.41 (95% IC 1.02, 5.69; p<0.05; tendència lineal, p=0.02). Situar-se al quintil més alt d'ingesta de llet comparat amb la resta de la població, doblava el risc de tenir autoanticossos contra RF (OR:2.38 [95% IC 1.28,4.42]; p<0.01). L'associació d'ingesta de llet amb la titulació d'autoanticossos era significativa tant si es tractava de llet sencera o llet amb menys greix (desnatada/semidesnatada).

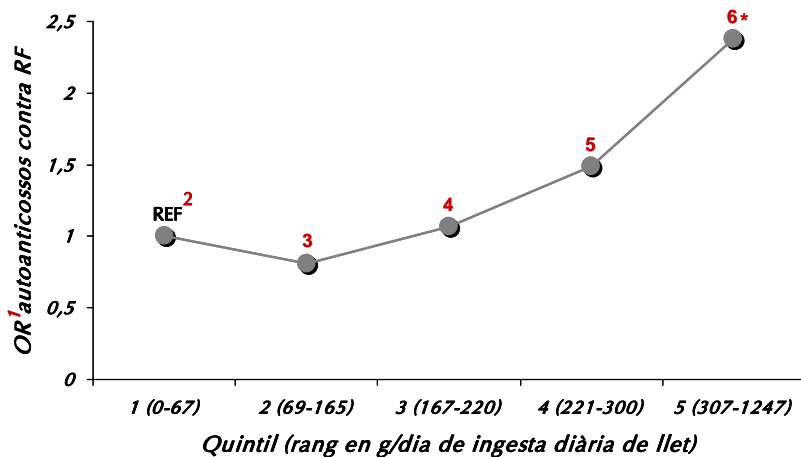


FIGURA 25. Risc de ser portador d'autoanticossos contra receptors de folat en cada quintil d'ingesta de llet comparat amb el quintil més baix.
(¹OR: Odds ratio, ²REF: quintil de referència, ³[95% IC: 0.28, 2.37], ⁴[95% IC: 0.41, 2.80], ⁵[95% IC: 0.58, 3.67], ⁶[95% IC: 1.02, 5.69], *p<0.05)

6. Discussió

La prevalença d'autoanticossos contra RF és del 7.2% en aquesta mostra representativa d'una població d'homes i dones, amb baixa exposició a la fortificació d'aliments amb àcid fòlic. La ingesta més alta de llet estava associada amb un risc més alt de tenir autoanticossos contra RF.

A Espanya no és obligatori la fortificació d'aliments amb àcid fòlic. Només un 1.6% de la població estudiada prenia suplementes d'àcid fòlic. Entre els participants adults de la nostra població la freqüència de consumidors de cereals d'esmorzar (10.1%) és inferior al 49.8% publicat en un estudi de nens i adults joves espanyols.¹³²

Tot i que l'estat en folats és similar entre portadors i no portadors d'autoanticossos contra RF, el folat plasmàtic i la titulació d'aquests autoanticossos interactuaven en les seves associacions amb la tHcy. Això indica que l'associació del folat sobre la tHcy és diferent a concentracions diferents de titulació d'autoanticossos contra RF, per tant, la

seva presència interfereix amb l'efecte del folat sobre la tHcy. Si el bloqueig del transport de folat a nivell de RF no és suficientment compensat per un altre mecanisme de transport, això podria afectar la biodisponibilitat del folat per la remetilació de la Hcy amb el resultat d'un increment en la tHcy. La reducció mitjana en tHcy associada amb l'increment de folat plasmàtic era menor en portadors que en no portadors d'autoanticossos contra RF i no significatiu. El increment en la titulació d'autoanticossos contra RF estava associada amb l'augment de la tHcy, tot i que no era significativa. Degut al número petit de portadors d'autoanticossos a la nostra població, és possible que no tinguéssim suficient potència estadística per trobar una associació significativa.

La mitjana de la titulació d'autoanticossos contra RF és considerablement més baixa que les titulacions prèviament publicades que han estat associades amb condicions patològiques de l'embaràs²⁰⁹ o el desenvolupament neuronal a la infantesa.^{204,205,215,218} L'estat en folat era pitjor entre mares de nens amb FLP portadores (tHcy: 12.0 µmol/L, folat sèric: 13.0 nmol/L) que en no portadores (tHcy: 10.4 µmol/L, folat sèric: 22.0 nmol/L) d'autoanticossos contra RF.²¹¹ Nosaltres no hem observat cap diferència en l'estat en folat entre portadors i no portadors d'autoanticossos contra RF utilitzant l'anàlisi bivariat. Hi ha la possibilitat que la presència d'autoanticossos contra RF pot només ser important en situacions / òrgans amb una alta expressió de RF degut als elevats requeriments, com és el cas del desenvolupament embrionari. Sota algunes circumstàncies normals els requeriments en folat podrien trobar altres rutes de transport de folat, com és el cas del RFC que s'expressa de forma constitutiva a gairebé tots els tipus cel·lulars,¹³³ o el sistema PCFT¹³⁵ descrit recentment en teixits més específics. Sembla que en la població general, aquestes rutes són suficients per contrarestar l'efecte del bloqueig del transport de folat a nivell de RF i a baixes titulacions d'autoanticossos contra RF.

Ramaekers i els seus col·laboradors (2008)²⁰⁵ van proposar que l'exposició repetida al tracte digestiu de RF de llet bovina podria resultar en la producció d'autoanticossos contra RF. El 90% de la nostra població van afirmar ser consumidors de llet a un nivell semblant a la població americana²⁵⁰ però inferior a la d'altres poblacions

europes.²⁵¹ Els nostres resultats mostren que els consumidors d'entre 307-1247 g/d de llet, independentment de que es tracti de llet sencera o amb menys greix (desnatada/semidesnatada), tenen el doble de risc de ser portadors d'autoanticossos contra RF comparat amb la resta de la població. Com el consum de llet és extensa en la nostra població però només una petita minoria tenen autoanticossos contra RF, quantitats majors de llet consumida són necessàries per produir aquests autoanticossos o altres factors desconeguts que contibueixin a la producció d'aquesta resposta immune. La llet bovina és rica en FBP.²³ Prèviament ha estat proposat que un sistema immune gastrointestinal podria tenir un paper important en la producció d'autoanticossos contra RF associat amb la ingesta de llet en nens.²⁰⁵ Les plaques de Peyer, que formen una important part del sistema immune de la mucosa gastrointestinal, són riques en cel·lules immunitàries. Els possibles antígens alimentaris transportats des del lumen de l'intestí per les cel·lules M són presentats al sistema immune en aquest punt. La tolerància a aquests és conferit per cel·lules dendrítiques especialitzades i cel·lules T reguladores. A més a més, la secreció de IgA proporciona una protecció addicional contra antígens dietètics.^{252,253} Qualsevol anomalia en la inducció de la tolerància durant la infància temprana degut a infecció, inflamació o factors genètics podria potenciar la resposta immune que podria estar estimulat per l'exposició repetida del antígen a la vida adulta. Això sembla factible ja que prèviament ha estat observada la resposta immune d'autoanticossos contra RF des de nens de 1 any fins a adults joves de 16-19 anys.²⁰⁵ La baixa titulació d'autoanticossos contra RF en la majoria dels casos pot no ser patològic. Però, la titulació d'autoanticossos a la sang probablement reflecteix només una fracció del anticòs ja que la majoria és segrestat a teixits que expressen aquest receptor de membrana.

Una resposta immune a nous antígens provocat per la homocisteïnilització de residus de lisina del RF en presència de HTL ha estat proposat com un possible mecanisme pel qual els autoanticossos contra RF podrien produir-se.^{220,221} La HTL constitueix fins un 0.28% de la tHcy²⁵⁴ i la N-homocisteïnilització pot produir-se inclús a concentracions de HTL tant baixes com 10 nmol/L.²⁵⁵ No s'han mesurat les concentracions de HTL en la nostra població. Però en la nostra població sembla poc

probable aquesta causa de producció d'autoanticossos contra RF ja que no s'observen diferències en les concentracions mitjanes de tHcy entre portadors i no portadors d'autoanticossos. El rang de tHcy en cadascun d'aquests grups era: 5.8-20.3 $\mu\text{mol/L}$ i 4.4-33.8 $\mu\text{mol/L}$, respectivament. A més a més, estant al decil més alt de tHcy no incrementava el risc de producció d'autoanticossos contra RF.

Es conclou que tant homes com dones adults entre 18-75 anys poden produir autoanticossos contra RF. A baixes concentracions aquests autoanticossos no afecten l'estat nutricional en folats. No obstant, en presència d'autoanticossos hi ha tendència a incrementar la tHcy. El consum elevat de llet és un factor de risc per la producció d'autoanticossos contra RF.



CAPÍTOL 3

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT DURANT LA PRECONCEPCIÓ I DURANT L'EMBARÀS

*Fertil Steril, 2008 Oct 22
doi:10.1016/j.fertnstert.2008.08.104*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

CAPÍTOL 3

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT DURANT LA PRECONCEPCIÓ I DURANT L'EMBARÀS

1. Introducció

Els folats juguen un paper important en la reproducció humana.^{256,257} La biodisponibilitat fisiològica adequada en folats resulta vital durant el període crític de divisió intensa cel·lular que es produeix a la concepció i a les primeres etapes de la gestació. Nivells subòptims en folats han estat associats amb anomalies periconcepcionals com els DTN.^{80,258,259} El paper dels folats en altres processos anòmals de la periconcepció encara és desconegut.

Aproximadament un 25% d'embarassos no són detectats clínicament degut a AE primerencs,²⁶⁰ els quals passen inadvertits per la mateixa dona. I un 12% dels diagnosticats acaben en AE.²⁶¹ La subfertilitat, definida com la probabilitat més baixa del normal de concepció durant un cicle menstrual²⁶² és una altra complicació associada als estadis més primerencs de la concepció i del desenvolupament humà. La temporalitat i la dificultat en la detecció d'aquests dos tipus de complicacions, complica la investigació de les seves etiologies, especialment quan es produeixen per primera vegada.

La importància de l'estat en folats als diferents períodes del desenvolupament temprà ha estat definit en diversos treballs. L'aportació insuficient en folats durant la fase de divisió cel·lular exponencial que es produeix després de la fecundació, ha estat associada amb implantació i viabilitat embrionària afectades,²⁶³ un increment del procés d'apoptosi de les cèl·lules citotrofoblàstiques humanes²⁶⁴ i risc d'AE.²⁶⁵

Da Costa i els seus col·laboradors al 2003 demostraven el important paper dels RF materns durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari en rata.²¹⁰ El mateix grup, proposava que el bloqueig del lloc específic d'unió pels folats d'aquests, podria tenir un efecte en els primers processos de la reproducció en rata. El bloqueig dels RF per autoanticossos ha estat proposat com possible causa etiològica de DTN.^{209,211,220} Si el bloqueig per autoanticossos dels RF succeís després de la fecundació, podria impedir el transport de folat de mare a embrió. La conseqüència seria l'alteració de quantitat de vitamina disponible per les primeres divisions cel·lulars i la formació de les tres fulles embrionàries (ectoderm, endoderm i mesoderm) a partir de les quals en deriven els diferents tipus de teixits i òrgans,⁸³ durant el període crític d'embriogènesi.

2. Hipòtesi i Objectius particulars

La presència d'autoanticossos contra RF a la preconcepció, podria ser la causa d'una alteració en la biodisponibilitat de folats durant els primers estadis de divisió cel·lular i l'embriogènesi. Aquest bloqueig pot afectar a la implantació, o al desenvolupament dels estadis més primerencs de divisió cel·lular després de la fecundació, traduint-se en subfertilitat. Si aquesta alteració del transport és produït al primer trimestre d'embaràs, el desenvolupament de l'embrió viable implantat es veuria afectat acabant en AE.

Els objectius particulars plantejats en aquest capítol són:

- Determinar la presència d'autoanticossos contra RF de forma longitudinal a la fase preconcepcional en dones planificant un embaràs.
- Investigar l'associació entre la presència d'autoanticossos contra RF i la subfertilitat.
- Investigar l'associació entre la presència d'autoanticossos contra RF durant el primer trimestre d'embaràs i AE d'embrió viable diagnosticat ecogràficament.

3. Disseny de l'estudi

Les participants sotmeses a estudi provenen dels dos estudis longitudinals sobre embaràs (PreC i NUTCIR). La FIGURA 26 resumeix de quin estudi provenen els casos i controls seleccionats per l'estudi de la subfertilitat i per l'AE.

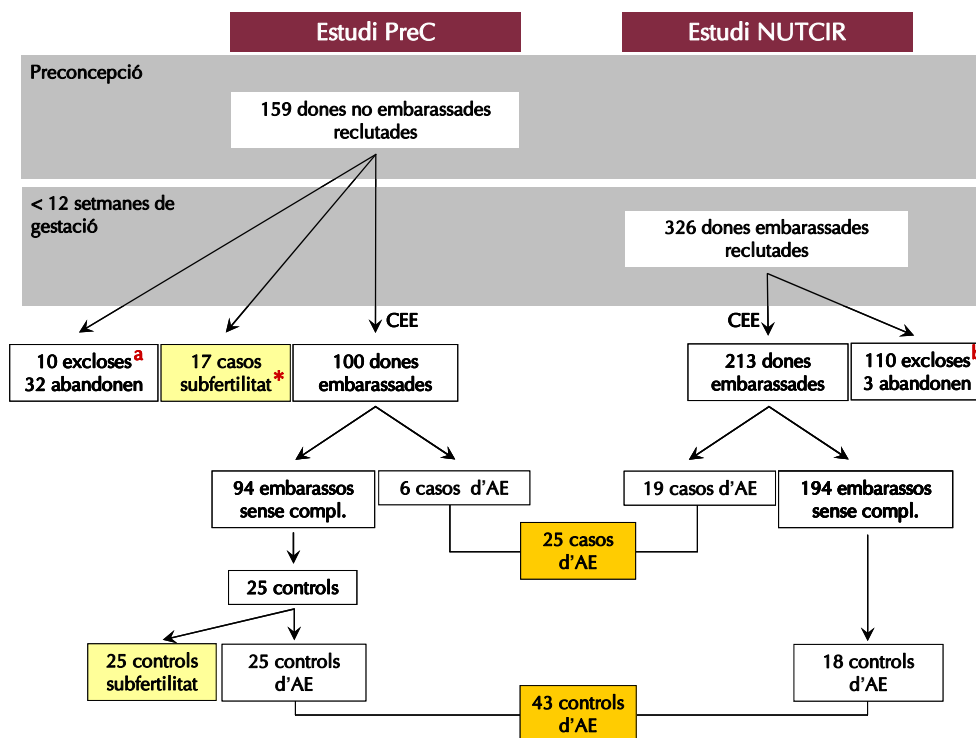


FIGURA 26. Diagrama de reclutament de casos / controls per subfertilitat i per avortament espontani a partir dels Estudis PreC i NUTCIR.

(CEE: confirmació d'embaràs per ecografia, compl.: complicacions, *Subfertilitat: absència de concepció durant 12 o més cicles mensuals, AE: avortament espontani, ^aveure criteris d'exclusió a la pàgina 67, ^bveure criteris d'exclusió a la pàgina 70. A l'apartat de Material i Metodologia s'han exposat les tècniques utilitzades per les diferents determinacions biològiques)

Casos i controls per subfertilitat

Tant casos com controls per subfertilitat, provenen de l'estudi PreC (FIGURA 26). S'identifiquen els casos de subfertilitat com aquelles participants que després de 4 repeticions de la visita preconcepcional (4 extraccions sanguínies a la preconcepció) no es van quedar embarassades, i que van confirmar no estar embarassades quan es va contactar amb elles per programar una quarta extracció sanguínia preconcepcional (en total, després de 12 cicles mensuals intentat quedar-se embarassades). Es van detectar 17 casos de subfertilitat. Aquests casos de subfertilitat, s'han aparellat amb 25 controls, que havien tingut un embaràs amb èxit, després de proporcionar una mostra sanguínia preconcepcional. D'aquests controls, a més a més, es compta amb les mostres sanguínies recollides als tres trimestres de l'embaràs (setmanes 8, 20 i 32), amb una mostra del moment del part i de la vena del cordó.

Casos i controls per AE

En aquest grup es van incloure participants tant de l'Estudi PreC com del NUTCIR (FIGURA 26). El moment de recollida de la mostra sanguínia difereix en els dos estudis. A les 8 setmanes de gestació al PreC i, entre les 8 i 12 setmanes en el cas del NUTCIR. En 4 dels 19 casos provinents del NUTCIR, també es compta amb una mostra sanguínia corresponent a les 15 setmanes de gestació, doncs encara no havien avortat en aquest punt. En total, es van detectar 25 casos d'AE, 6 procedents del PreC i 19 del NUTCIR. Aquests casos, han estat aparellats amb 43 controls que havien tingut un embaràs sense complicacions. Els 43 controls provenien: 25 del PreC (els mateixos que han estat utilitzats per comparar amb els casos de subfertilitat) i, 18 del NUTCIR que van ser aparellats amb els 19 casos d'AE del mateix estudi.

Tant per subfertilitat com per AE, casos i controls van ser aparellats per paritat, edat, IMC i hàbit tabàquic.

Suplementació amb àcid fòlic

Cap de les participants de l'Estudi PreC prenien suplementes d'àcid fòlic durant la fase preconcepcional ja que aquest es va portar a terme abans d'adoptar-se les recomanacions actuals a Espanya sobre suplementació periconcepcional amb àcid

fòlic.¹³¹ A més a més, a Espanya la farina no està fortificada amb àcid fòlic. A l'Estudi NUTCIR, a les dones que no prenen suplementes amb àcid fòlic abans de la primera visita antenatal, l'obstetra els en prescrivia fins al final del primer trimestre d'embaràs seguint les recomanacions actuals de la *Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia* (SEGO) i del *Sistema Nacional de Salud* a Espanya.²⁶⁶

4. Anàlisi estadística

Els resultats de les variables quantitatives s'expressen com a mitjana i DE. La freqüència d'incidència d'autoanticossos contra RF, els hàbits tabàquics i l'ús de contraceptius orals (variables dicotòmiques) entre casos i controls per subfertilitat i per AE van ser comparades utilitzant la prova de la ji-quadrat. La mitjana d'edat i IMC es van comparar entre casos i controls utilitzant l'ANOVA. La variable de tHcy va ser log-transformada per tal de normalitzar la seva distribució i poder aplicar proves paramètriques.

L'anàlisi de regressió logística, es va utilitzar per estimar la OR de patir subfertilitat entre les portadores d'autoanticossos contra RF comparat amb no portadores. El model va ser ajustat pels factors confusors que influeixen en la fertilitat de la mare: edat, hàbit de fumar, IMC i tHcy. El nivell de significació acceptat va ser de $p < 0.05$.

5. Resultats

Les característiques basals de les participants estan resumides a la **TAULA 8**. No hi ha diferències significatives entre casos i controls per subfertilitat. Quatre casos del grup d'AE eren més grans (30-40 anys d'edat), fet que incrementava la mitjana d'edat del grup. Excloent aquestes del grup, els resultats i les conclusions no es veien afectades.

Entre el grup de subfertilitat, es va disposar d'un total de 83 mostres separades entre elles de 10 a 12 setmanes, i 104 mostres provinents dels controls. En 18 de les 83 mostres dels casos de subfertilitat, es van detectar titulacions positives per autoanticossos contra RF comparat amb 1 d'entre les 104 mostres analitzades dels

controls ($p < 0.001$). Almenys una lectura positiva per autoanticossos contra RF del total de mostres avaluades de cada participant, es va observar en un 29.4% (5/17) [mitjana (DE) titulació: 0.88 pmol RF blocat/mL plasma (0.39)] de casos de subfertilitat comparat amb el 4% (1/25) [titulació: 0.19 pmol RF blocat/mL plasma] del grup control.

TAULA 8. Característiques basals dels casos i controls per subfertilitat i per avortament espontani.

	Subfertilitat		Avortament Espontani	
	Visita preconcepcional		Primera visita antenatal	
	Casos	Controls	Casos	Controls
N	17	25	25	43
Edat (anys), mitjana (DE) ¹	30.5 (3.1)	29.3 (2.5)	32.6 (4.0)*	30.7 (3.3)
IMC ² (Kg/m ²), mitjana (DE)	23.8 (3.8)	22.9 (2.4)	22.9 (2.5)	22.8 (2.1)
Fumadores, n (%)	7 (41.0)	7 (28.0)	5 (28.0)	9 (21.0)
Consum CO ³ , n (%)	4 (28.6)	9 (37.5)	ND ⁴	ND
tHcy ⁵ (µmol/L), mitjana (DE) [n] ⁶	8.0 (3.1) [15]	8.5 (2.0) [24]	7.7 (3.0) [21]	6.8 (1.7) [42]

¹DE: desviació estàndard, ²IMC: índex de massa corporal, ³CO: ús d'anticonceptius orals 6 mesos previs a quedar-se embarassada, ⁴ND: no disponibilitat de dades, ⁵Homocisteïna plasmàtica total en dejú en subfertilitat: de cada participant es va calcular la mitjana de totes les visites preconcepcionals; homocisteïna plasmàtica total en dejú en avortament espontani: primera visita antenatal (7.5-12 setmanes de gestació), ⁶nombre de mostres disponibles, *ANOVA, més grans que els controls ($p < 0.05$).

Ajustant per edat, hàbit de fumar, IMC i tHcy, el risc de patir subfertilitat era 12 vegades superior en dones amb autoanticossos comparat amb les que no els presentaven [OR 12 (95% IC: 1.9, 129.6); $p < 0.05$].

Les titulacions d'autoanticossos de les diferents mostres sanguínies de les 6 dones positives per autoanticossos, presenten fluctuacions (TAULA 9). El temps transcorregut entre cada mostra de cada participant és de 12 setmanes. En aquestes 6 participants vam observar entre 1 i 3 vegades valors de titulacions d'autoanticossos per sota del límit de detecció (0.1 pmol RF blocat/mL) durant el temps que van ser controlades. La

resta de dones presentaven lectures negatives per autoanticossos en totes les seves mostres (fins a 7 mostres cadascuna, recollides a una distància entre elles de 12 setmanes).

Entre els 17 casos de subfertilitat, 5 van aconseguir quedar-se embarassades entre 12-19 mesos després d'intentar-ho. Entre aquests 5 casos, només un era positiu per autoanticossos contra RF, i va aconseguir un embaràs després de 19 mesos de intentar-ho, i del que va néixer un nadó a terme amb un pes entre els percentils 25 i 50 pel seu gènere i edat gestacional (cas 2, **TAULA 9**).

No es van detectar autoanticossos contra RF en cap de les participants del grup de casos d'AE.

TAULA 9. Resum de titulacions d'autoanticossos contra receptors de folat en dones amb titulacions positives en almenys una ocasió

	Preconcepció Visites preconceptionals								Embaràs Trimestres			Part	Cordó	
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3			
1 ¹	M ²	0.41 ³	0.53	0 ⁴	0.46	0	0.45	0.48						
2	0.93	0	1.18	1.21	1.23	1.27			1.21	1.25	1.23	1.37	1.32	
3	0	0	0	0.48										
4	0	0	0	0	0.22	0								
5	0	0.63	0	M										
6	0.19								0					

¹1,2,3,4,5 (casos de subfertilitat), ⁶(control), ²M: mostra insuficient, ³pmol FR blocat/mL de plasma, ⁴valor per sota del límit detectable.

6. Discussió

Aquest estudi demostra una associació entre la presència d'autoanticossos capaços de bloquejar el RF i la subfertilitat. Aproximadament un 30% dels casos de subfertilitat no són explicats per les causes convencionals descrites a la literatura com per exemple l'endometriosi, un defecte tubàric, absència l'ovulació o anomalies genètiques entre

d'altres.^{181,267} En aquesta mostra de dones espanyoles sanes en edat fèrtil s'observa que tenir autoanticossos contra RF que bloquegen el transport de folats a nivell de RF és un factor de risc significatiu per subfertilitat. L'arribada de folat a la cèl·lula és especialment important en processos reproductius.¹⁸¹ L'alteració en aquest mecanisme podria afectar la síntesi i reparació de l'ADN, l'apoptosis i desencadenar els mecanismes d'estrès oxidatiu. Les espècies d'oxigen altament reactives tenen funcions importants en el tracte reproductiu femení com la maduració d'oòcits, però un increment en la producció d'aquestes espècies tenen una influència sobre el desenvolupament embrionari a partir de la modificació de l'expressió gènica dels gens implicats. Aquestes espècies d'oxigen han estat relacionades amb alteracions en el procés de fecundació de l'oòcit i en el procés d'implantació.^{268,269} Per tant, la inhibició de l'arribada de suficient folat, podria afectar la qualitat de les gàmetes, la implantació, el desenvolupament embrionari i el manteniment de l'embaràs. També ha estat descrit l'efecte de la hipometilació de l'ADN sobre l'expressió del gen *Cyp19* a les cèl·lules de la granulosa, el qual desenvolupa una important funció en la síntesi d'estrogen durant el desenvolupament fol·licular.²⁷⁰

La importància dels RF en assolir una gestació a terme quan la funció del RF està alterada ha estat descrita anteriorment en rates.²¹⁰ Autoanticossos materns contra RF, han estat associats amb els DTN, anomalies derivades de problemes del desenvolupament durant les primeres etapes de l'embaràs.²⁰⁹ Les formes de folat reduït són essencials durant el període embrionari preimplantacional.²⁶³ En el cas de la subfertilitat, l'estat en folat adequat durant la fase de ràpida divisió cel·lular després de la fecundació, podria afavorir la viabilitat de l'embrió i la implantació o el manteniment de l'embaràs.^{263,210}

En un dels casos de subfertilitat, de sis mostres preconceptionals analitzades, només en una no es va detectar autoanticossos contra RF. En la resta varen presentar titulacions en autoanticossos molt altes (cas 2 de la TAULA 9). Aquesta participant després de 19 mesos va quedar-se embarassada i va tenir un nadó a terme amb un pes neonatal entre P_{25-50} . Les tres mostres de l'embaràs, la mostra del treball de part i la del cordó eren també positives per autoanticossos contra RF, i amb titulacions

d'autoanticossos contra RF molt similars a les preconceptionals. Això indicaria que els canvis fisiològics que succeeixen durant l'embaràs no afecten a la presència d'autoanticossos contra RF.

Aquest és el primer estudi que investiga la presència d'autoanticossos contra RF en mostres repetides recollides longitudinalment durant la preconcepció i l'embaràs, i a intervals relativament curts. S'ha detectat la presència d'autoanticossos contra RF tant abans com durant l'embaràs, i s'ha observat que en alguns casos les titulacions disminueixen a nivells per sota del límit de detecció. Un artefacte en les condicions de detecció d'autoanticossos contra RF seria poc probable, ja que totes les mostres de la mateixa participant han estat analitzades dins la mateixa tanda de mostres, tal com s'ha exposat en el **CAPÍTOL 1**. A més, cada tanda de mostres es llegia amb controls interns, de mostres positives i negatives per autoanticossos. S'ha observat una fluctuació en la titulació d'autoanticossos quan la titulació és baixa en altres condicions autoimmunes, com per exemple la diabetis mellitus autoimmune o de tipus I.^{271,272}

Ha estat observat el caràcter transitiu d'aquests autoanticossos en un estudi d'intervenció anterior.²⁰⁵ Els autors proposaven com a possibles responsables de la generació d'aquests autoanticossos contra RF, els RF solubles presents a la llet, i per tant un efecte a nivell de la barrera immunològica del tracte gastrointestinal podria ser la possible ruta d'exposició de l'antígen (RF soluble de llet de vaca) responsable de la producció d'autoanticossos contra RF. En aquest estudi (PreC), no es va registrar la ingesta de llet.

No s'ha detectat la presència d'autoanticossos contra RF en mostres recollides abans del AE en cap de les participants que van patir aquesta complicació d'embaràs. Aquests resultats contrasten amb els d'un treball anterior,²¹² on les dones portadores d'autoanticossos contra RF tenien almenys 3 vegades més probabilitat de patir un AE que les dones que no els tenien. Tot i que nosaltres tenim un menor nombre de casos d'AE, la diferència fonamental entre els dos estudis és el moment de recollida de les mostres. En el treball de Neuman i els seus col·laboradors,²¹² la mostra de sang era

recollida quan la dona ja no estava embarassada, després d'avortar. Nosaltres comptem amb mostres a la preconcepció i/o durant l'embaràs, però sempre abans de patir l'AE. Si la presència d'autoanticossos contra RF fluctua al llarg del temps, seria possible que en el moment en què s'ha avaluat la seva presència no estiguessin presents. Tot i així, el no haver-los detectat abans de l'AE suggereix que probablement no siguin la causa més probable d'AE en el nostre estudi. Cap dels dissenys dels estudis dels que provenen les mostres (PreC i NUTCIR), va contemplar la recollida de mostra de sang després de l'AE, per aquesta raó no és possible l'avaluació de la presència d'autoanticossos després del succés. S'ha proposat que l'aparició d'autoanticossos contra RF podrien ser produïts com a resultat de l'AE més que com una possible causa.²⁰⁹ L'exposició a epítops generats per la proteòlisi de teixits reproductius podria ser la desencadenant de la producció d'aquests autoanticossos contra RF.

Una limitació del nostre estudi ha estat el moment de recollida de les mostres en referència als AE. Les mostres provinents de l'estudi PreC, van ser recollides a les 8 setmanes gestacionals, mentre que les del NUTCIR, entre les 8 i 12 setmanes. Pel disseny d'aquests estudis els AE anteriors a aquestes setmanes gestacionals no s'han detectat. I per tant, la possible relació amb la presència d'autoanticossos es perdi a més avançades setmanes de gestació. Els resultats obtinguts tant entre el grup de subfertilitat com entre els d'AE, podria ser indicatiu de què l'efecte de la presència d'autoanticossos contra RF, es limita a les etapes periconcepcionals, probablement molt més sensible a la presència d'aquests. Les múltiples causes d'AE, reduirien la possibilitat de determinar en el nostre estudi el paper dels autoanticossos contra RF en aquesta complicació de l'embaràs. S'hauria d'explorar en un estudi aquesta hipòtesi amb l'objectiu d'investigar autoanticossos contra RF com a causa d'AE amb suficient potència estadística.

Les mesures preventives de la suplementació amb àcid fòlic han tingut èxit en la reducció de la incidència⁸⁸ i en la recurrència⁸⁷ de DTN. La forma oxidada de folat, té una alta afinitat pel RF. Si l'afinitat de l'àcid fòlic pel RF és major que la de l'autoanticòs blocant, l'àcid fòlic podria ser capaç de desplaçar aquests

autoanticossos que estarien blocant el lloc específic d'unió del RF. Aquest seria un possible mecanisme pel qual la suplementació amb àcid fòlic podria protegir contra DTN²⁰⁹ i altres complicacions del desenvolupament embrionari en portadores d'autoanticossos contra RF. De la mateixa manera doncs, l'àcid fòlic provinent de la suplementació preconcepcional podria tenir un efecte positiu en casos de subfertilitat en presència d'autoanticossos contra RF.

Es requereix investigar més sobre la naturalesa de l'associació entre els autoanticossos contra RF i la subfertilitat i, els beneficis potencials de l'ús de supressors immunes, corticosteroides i altes dosis d'àcid fòlic en aquest desordre.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009



CAPÍTOL 4

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT EN COMPLICACIONS DE L'EMBARÀS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

CAPÍTOL 4

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT EN COMPLICACIONS DE L'EMBARÀS

1. Introducció

El resultat final de l'embaràs ve determinat per múltiples factors, tant genètics com ambientals d'origen matern i fetal. A part de les múltiples complicacions de l'embaràs relacionades amb el dèficit de folats,²⁵⁷ el pes al néixer ha suscitat interès, per les possibles conseqüències que pot tenir sobre la mortalitat perinatal i la morbiditat neonatal. Un pes adequat al néixer, és el resultat d'haver assolit un potencial de creixement *in utero* adient per la constitució genètica del nounat, que permetrà la bona adaptació del nounat al període neonatal i durant la infància.²⁷³ S'ha suggerit que el pes baix al néixer és el desencadenant de diferents patologies cròniques com per exemple malaltia cardiovascular i hipertensió durant la vida adulta, responsables d'una elevada morbimortalitat en la nostra societat.^{274,275,276}

Quan un fetus no assoleix el seu potencial de creixement per l'edat gestacional es tracta d'un creixement intrauterí retardat (CIR).²⁷⁷ El diagnòstic de CIR és un pes de naixement per sota del P₁₀ de les corbes de creixement fetal segons el seu gènere i l'edat gestacional,²⁷⁸ tot i que hi ha autors que els classifiquen més estrictament per sota del P₃²⁷⁷ o d'altres per sota del P₁₅.²⁷⁹ La seva etiopatogènia és molt heterogènia. S'identifiquen diversos factors materns (hàbit tabàquic, drogoaddicció, consum d'alcohol i de cafeïna, diversos components vasculars que redueixen el flux sanguini), fetals (cromosomopaties i altres defectes genètics) i, placentaris (vasculopatia placentària) entre d'altres.²⁷⁷ L'estat nutricional de la mare és important durant el progrés de l'embaràs tant per les necessitats de la pròpia gestant com pel fetus en desenvolupament.²⁸⁰ La demanda de nutrients per part del fetus és satisfeta per la transferència d'aquests a través de la placenta. Si bé és important un bon estat

nutricional en folats per part de la mare, el correcte transport a través de la placenta serà determinant pel desenvolupament de l'embaràs. El fetus pot regular el transport placentari de nutrients a través de la despesa cardíaca fetal i el grau de utilització dels nutrients.²⁸¹ El transport placentari materno-fetal del folat es produeix en dos passos.²⁸² Primer es produeix una captació del 5-MTHF circulant al costat matern per unió als RF. En contra de gradient aquest folat s'anirà acumulant a l'espai intervellós triplicant la seva concentració respecte a la circulació materna. Aquest folat acumulat s'alliberarà passivament a la circulació fetal a favor de gradient. Aquest mecanisme assegura la mínima influència de les fluctuacions en les ingestes de folats per part de la mare. També han estat descrites concentracions elevades a l'espai intervellós de Cbl, vitamina íntimament relacionada amb la funció dels folats com a cofactor en la transferència de grups metil per la remetilació de la Hcy,⁵² seguint un patró d'acumulació molt semblant al dels folats.²⁸³

Ha estat descrita l'associació de concentracions baixes de folat plasmàtic matern a les 28 i a les 30 setmanes de gestació amb baix pes al néixer (nadó amb pes <2500g)²⁸⁴ i amb CIR (<P₁₅ per la seva edat gestacional),²⁷⁹ respectivament. Concentracions de tHcy (com a biomarcador de l'estat en folats) al tercil més alt a les 8 setmanes de gestació i al treball de part, s'han relacionat amb un augment de risc de tres i quatre vegades) respectivament, de tenir un nadó amb un pes al tercil més baix de la població estudiada (< 3120 g).²²⁴

La presència d'autoanticossos contra RF entre les 15 i les 18 setmanes de gestació, ha estat relacionada amb el risc de DTN.²²⁰

2. Hipòtesi i Objectius particulars

La presència d'autoanticossos contra RF podrien interferir amb el procés d'acumulació de folats a la placenta. Aquest bloqueig podria perjudicar l'estat en folats al cordó amb la subseqüent alteració del desenvolupament del fetus i per tant de la corba normal de creixement del nounat.

Els objectius particulars plantejats en aquest capítol són:

- Investigar l'efecte de la presència d'autoanticossos contra RF en qualsevol moment de l'embaràs sobre l'estat en folats de la mare i la presència d'autoanticossos contra RF al cordó sobre l'estat en folats al cordó.
- Investigar la conseqüència de la presència d'autoanticossos contra RF en qualsevol moment de l'embaràs i al cordó, sobre el pes de naixement.

3. Disseny de l'estudi

La mostra que conforma aquest estudi consta de 189 voluntàries procedents de l'Estudi NUTCIR, amb un total de 965 mostres. A la **FIGURA 27** es detalla el número de mostres de les que es va disposar en cada punt de l'embaràs estudiat, la relació del número de determinacions biològiques i de la titulació d'autoanticossos contra RF. En 25 de les 965 mostres, no va ser possible determinar la titulació d'autoanticossos contra RF. Les causes foren: alt grau d'hemòlisi en 23 mostres (21 de cordó i 2 maternes), pèrdua de volum de mostra en el trasllat de mostres de Reus a SUNY (1 mostra) i error comès en el processament de la tècnica del *blocking* (1 mostra).

Casos de creixement intrauterí retardat (CIR)

Per la identificació dels casos de CIR, es van utilitzar les taules espanyoles de pesos neonatals segons edat gestacional i sexe, de la *Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia*. Es defineixen els casos de CIR com aquells nadons amb un pes al néixer per sota del P₁₀ per la seva edat gestacional i sexe.

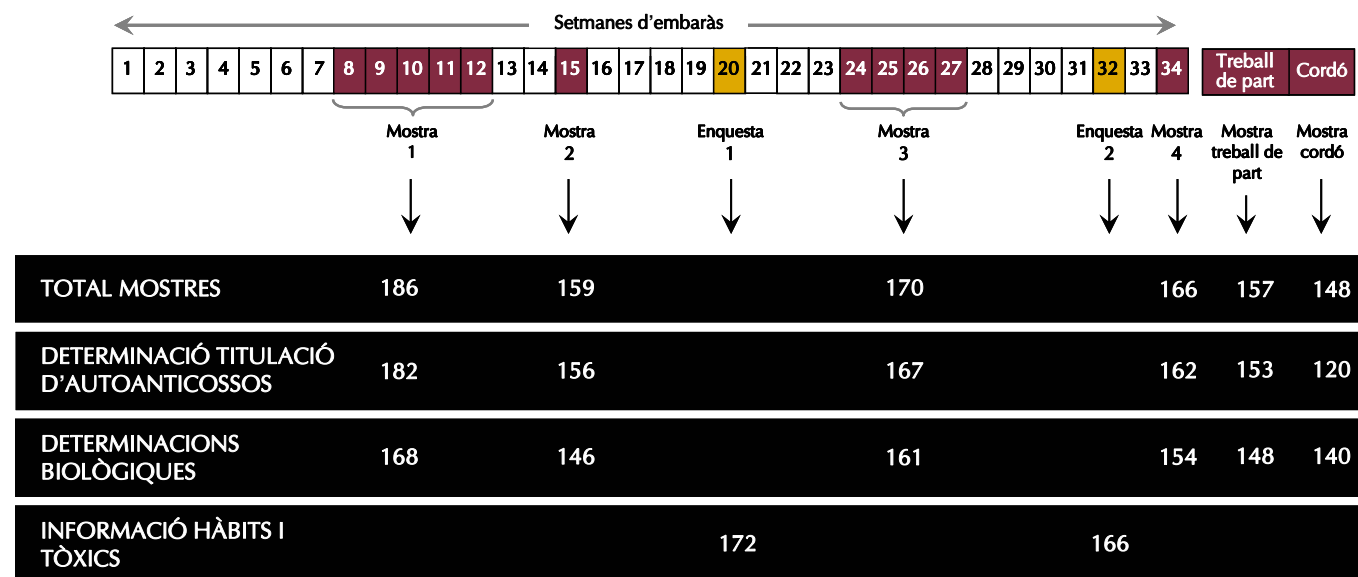


FIGURA 27. Resum del número de mostres analitzades i dades disponibles de l'Estudi NUTCIR.

(Determinacions biològiques: folat plasmàtic, cobalamina plasmàtica, homocisteïna plasmàtica total en dejú per totes les mostres i, cotinina plasmàtica per la mostra 1 i el cordó. A l'apartat de Material i Metodologia s'han exposat les tècniques utilitzades per les diferents determinacions biològiques i rangs de classificació d'exposició al tabac per la cotinina plasmàtica. A l'Annex 2 es reproduïx l'enquesta 1 i 2).

Suplementació amb àcid fòlic

A les participants se'ls ha aconsellat la suplementació amb àcid fòlic a l'etapa periconcepcional segons les recomanacions ministerials espanyoles de suplementació amb àcid fòlic a l'etapa periconcepcional.¹³¹ No obstant, comparat amb altres poblacions de països industrialitzats, han estat poc exposades a la fortificació d'aliments amb àcid fòlic, ja que a Espanya no és obligatori la fortificació amb àcid fòlic i, en quant a la fortificació voluntària a través del consum per exemple de cereals d'esmorzar encara és poc habitual comparat amb altres països industrialitzats.¹³²

4. Anàlisi estadística

Els resultats de les variables quantitatives s'expressen com a mitjana i DE. Les mitjanes d'edat i IMC es van comparar mitjançant l'ANOVA, i les distribucions de les variables qualitatives mitjançant la prova de la Ji-quadrat, entre portadores i no portadores d'autoanticossos contra RF. En el cas de no tenir una distribució normal es va aplicar la log-transformació, per tal de normalitzar la distribució i poder aplicar proves paramètriques (concretament en el cas de la tHcy).

Amb la prova de la Ji-quadrat, s'ha avaluat la relació entre la planificació de l'embaràs i el consum de suplementes d'àcid fòlic a la preconcepció. Per corregir per la variabilitat d'edat gestacional a l'hora de recollir les mostres sanguínies durant l'embaràs, vam ajustar els paràmetres bioquímics (folat plasmàtic, Cbl plasmàtica i tHcy) per l'edat gestacional (dies). S'han comparat les concentracions mitjanes de folat plasmàtic, Cbl plasmàtica i tHcy entre portadores i no portadores d'autoanticossos contra RF, en cadascun dels punts estudiats, amb la prova U de Mann-Whitney degut al baix nombre de portadores d'autoanticossos contra RF.

Es va utilitzar l'ANOVA de mesures repetides amb correcció *post-hoc* de Bonferroni, per explorar l'efecte de ser portadora d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs (factor inter-subjecte) sobre les concentracions de folat plasmàtic, Cbl plasmàtica i tHcy al llarg de l'embaràs (factor intra-subjecte).

Per investigar l'associació entre la presència d'autoanticossos contra RF en qualsevol moment de l'embaràs o al cordó i, el pes al moment de néixer o l'estat en folats al cordó es van ajustar diferents models de regressió lineal múltiple:

Model 1. Estudi de l'associació de la presència d'autoanticossos contra RF en qualsevol moment de la gestació sobre el pes al néixer.

Variable dependent: pes al néixer.

Variable independent: presència d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs.

Ajustat per les variables confusores: edat gestacional (setmanes) al moment del part, gènere del fetus, IMC materna, edat materna, concentració de cotinina plasmàtica al cordó, ús regular de ferro durant la gestació, consum de suplementes d'àcid fòlic al segon i tercer trimestres d'embaràs, concentració de tHcy al treball de part.²²⁴

Model 2. Estudi de l'associació de la presència d'autoanticossos contra RF en qualsevol moment de la gestació sobre la concentració de folat plasmàtic del cordó.

Variable dependent: folat plasmàtic al cordó.

Variable independent: presència d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs.

Ajustat per les variables confusores: edat gestacional, cotinina plasmàtica al cordó i consum de suplementes d'àcid fòlic al segon i tercer trimestres d'embaràs.

Model 3. Estudi de l'associació entre l'efecte de la presència d'autoanticossos contra RF en qualsevol moment de la gestació sobre la concentració de tHcy del cordó.

Variable dependent: tHcy al cordó.

Variable independent: presència d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs.

Ajustat per les variables confusores: edat gestacional, cotinina plasmàtica al cordó, folat plasmàtic al cordó i Cbl plasmàtica al cordó.

Model 4. Estudi de l'associació de l'efecte de la presència d'autoanticossos contra RF al cordó sobre la concentració de folat plasmàtic del cordó.

Variable dependent: folat plasmàtic al cordó.

Variable independent: presència d'autoanticossos contra RF al cordó.

Ajustat per les variables confusores: edat gestacional, cotinina plasmàtica al cordó i consum d'àcid fòlic al segon i tercer trimestres d'embaràs.

L'anàlisi de regressió logística múltiple ha estat la prova utilitzada per calcular:

- La OR de tenir un pes al néixer $\leq P_{25}$ en presència d'autoanticossos contra RF en algun moment de la gestació. El model va ser ajustat per les variables edat i IMC de la mare, cotinina plasmàtica al cordó, ús regular de suplement de ferro, tHcy al treball de part i edat gestacional.
- La OR de tenir autoanticossos contra RF al cordó en presència d'autoanticossos contra RF en algun moment de la gestació. El model va ser ajustat per edat materna, cotinina plasmàtica al cordó, i edat gestacional.
- La OR de tenir autoanticossos contra RF en algun moment de la gestació havent consumit aliments fortificats ó suplement d'àcid fòlic. El model va ser ajustat per edat materna, consum de suplement d'àcid fòlic al segon i tercer trimestre d'embaràs, cotinina plasmàtica al cordó i edat gestacional.

El nivell de significació utilitzat és de $p < 0.05$.

5. Resultats

La **TAULA 10** resumeix les característiques basals d'hàbits i estil de vida de les participants. No hi ha diferències significatives entre no portadores i portadores d'autoanticossos contra RF en les variables comparades.

TAULA 10. Característiques generals, d'hàbits i estil de vida en no portadores i portadores d'autoanticossos contra receptors de folat en algun moment de l'embaràs.

	No portadores	Portadores
N (%)	177 (93.6)	12 (6.3)
Edat ¹ (anys), mitjana (DE ²) [n]	31.4 (4.8) [136]	32.4 (3.7) [10]
IMC ³ (kg/m ²), mitjana (DE) [n]	23.4 (3.7) [131]	22.6 (1.9)[8]
Paritat ⁴		
- Cap fill, n (%) [n]	69 (50.7) [136]	4 (40.0) [10]
- 1 fill, n (%) [n]	58 (42.6) [136]	5 (50.0) [10]
- 2 fills, n (%) [n]	9 (6.6) [136]	1 (10.0) [10]
Hàbit tabàquic segons cotinina ⁵ mare		
- No fumadores, n (%) [n]	115 (73.7) [156]	9 (81.8) [11]
- Fumadores passives, n (%) [n]	15 (9.6) [156]	1 (9.1) [11]
- Fumadores actives, n (%) [n]	26 (16.7) [156]	1 (9.1) [11]
Hàbit tabàquic segons cotinina ⁵ cordó		
- No fumadores, n (%) [n]	105 (80.8) [130]	7 (77.8) [9]
- Fumadores passives, n (%) [n]	7 (5.4) [130]	2 (22.2) [9]
- Fumadores actives, n (%) [n]	18 (13.8) [130]	0 (0.0) [9]
Consum d'alcohol durant l'embaràs		
- A les 20 setmanes de gestació, n (%) [n]	31 (19.4) [160]	1 (8.3) [12]
- A les 32 setmanes de gestació, n (%) [n]	9 (5.6) [160]	1 (8.3) [12]
Consum de substàncies tòxiques durant l'embaràs, n (%) [n]	2 (1.3) [160]	0 (0.0) [12]
Suplements àcid fòlic a la preconcepció ⁶ , n (%) [n]	52 (34) [153]	4 (36.4) [11]
Suplements àcid fòlic al primer trimestre d'embaràs, n (%) [n]	148 (92.5) [160]	9 (75.0) [12]
Suplements àcid fòlic segon i tercer trimestre d'embaràs, n (%) [n]	34 (21.3) [160]	4 (33.0) [12]
Suplements de ferro, n (%) [n]	88 (89.8) [98]	8 (66.7) [12]
Consum habitual de cereals d'esmorzar, n (%) [n]	46 (28.8) [160]	5 (41.7) [12]
Ús de CO ⁷ abans de l'embaràs, n (%) [n]	15 (21.1) [71]	1 (12.5) [8]
Activitat física ⁸		
- Sedentària, n (%) [n]	58 (37.4) [155]	6 (50) [12]
- Moderadament activa, n (%) [n]	81 (52.3) [155]	4 (33.3) [12]
- Molt activa, n (%) [n]	16 (10.3) [155]	2 (16.7) [12]
Planificació de l'embaràs, n (%) [n]	120 (77.4) [155]	10 (83.3) [12]

¹Edat a la primera extracció sanguínia (8-12 setmanes de gestació), ²DE: desviació estàndard, ³IMC: índex de massa corporal a la primera visita antenatal, ⁴Número de fills vius, ⁵Classificació de les participants en l'hàbit tabàquic segons la concentració de cotinina plasmàtica a la primera extracció sanguínia (8-12 setmanes de gestació) i al cordó (<5 nmol/L: no fumadora, 5-85 nmol/L: fumadora passiva, >85 nmol/L: fumadora activa), ⁶Consum de suplements d'àcid fòlic durant els 3 mesos previs a l'embaràs, ⁷CO: ús de contraceptius orals 6 mesos previs a quedar-se embarassada, ⁸Classificació segons l'activitat física realitzada a l'ocupació laboral i durant el temps de lleure i, la freqüència d'aquesta última.

El consum de suplements d'àcid fòlic a la preconcepció és significativament més elevat en el grup que van planificar el seu embaràs respecte el que no ho van fer ($p < 0.001$).

Del total de 940 mostres analitzades, 23 eren positives per autoanticossos contra RF (2.4%). La **TAULA 11** descriu la freqüència de mostres positives per autoanticossos en cadascun dels moments estudiats, la mitjana, el rang i la DE de la titulació d'autoanticossos contra RF. Les mostres de cordó, són les que presenten un major percentatge d'autoanticossos contra RF, seguit per la mostra del treball de part (**TAULA 11**). Entre les 12 dones portadores d'autoanticossos en algun moment de la seva gestació, només una tenia dues mostres amb autoanticossos (mostra de 24-27 setmanes de gestació i mostra del cordó). La prevalença de portadores d'autoanticossos contra RF en algun moment de la gestació en la mostra estudiada és d'un 6.3%.

TAULA 11. Descripció de les mostres positives per autoanticossos contra receptors de folat en cada moment estudiat de l'embaràs i al cordó.

	Setmanes de gestació				Treball de part	Cordó
	8-12	15	24-27	34		
Total mostres ¹	182	156	167	162	153	120
n positius (% ²)	3 (1.6)	2 (1.3)	3 (1.8)	1 (0.6)	5 (3.3)	9 (7.5)
Titulació ³ mitjana	0.50	0.34	0.44	0.23	0.45	0.45
(rang)	(0.29-0.61)	(0.32-0.36)	(0.20-0.64)	-	(0.26-0.69)	(0.22-0.75)
[DE ⁴]	[0.10]	[0.22]	[0.13]	-	[0.82]	[0.07]

¹Número total de mostres analitzades, ²Percentatge de mostres positives per autoanticossos contra receptors de folat, ³**Titulació:** concentració mitjana d'autoanticossos contra receptors de folat per les mostres positives per autoanticossos en pmol RF blocat/mL, ⁴**DE:** desviació estàndard.

La **TAULA 12**, mostra les característiques dels embarassos de les portadores i les no portadores d'autoanticossos contra RF. No s'han detectat diferències significatives entre els dos grups.

TAULA 12. Característiques dels embarassos en les no portadores i portadores d'autoanticossos contra receptors de folat en algun moment de l'embaràs.

	No portadores	Portadores
Fetus gènere masculí, n (%) [n]	69 (45.4) [152]	6 (54.5) [11]
Edat gestacional ¹ (set), mitjana (DE) [n]	38.5 (2.7) [147]	39.2 (1.5) [11]
Pes al néixer (g), mitjana (DE) [n]	3136 (478) [152]	3189 (371) [11]
Casos de CIR ² , n (%) [n]	14 (9.3) [151]	1 (9.1) [11]

¹Edat gestacional del nadó al néixer, en setmanes complertes (set), ²CIR: creixement intrauterí retardat.

S'han comparat les mitjanes de folat plasmàtic, Cbl plasmàtica i tHcy en cadascuna de les 5 mostres maternes i del cordó, entre no portadores i portadores d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs (TAULA 13). El folat plasmàtic és significativament més elevat en les portadores que en les no portadores al primer trimestre d'embaràs, i al cordó. La tHcy és significativament inferior al primer trimestre d'embaràs i a les 24-27 i 34 setmanes de gestació en les portadores. La Cbl plasmàtica del cordó també està més elevada en les portadores tot i que tan sols s'aproxima a la significació en la mostra del cordó. La freqüència d'ús de suplementos vitamínics no va ser significativament diferent entre els 2 grups, ni a la preconcepció ni durant tot l'embaràs.

TAULA 13. Mitjanes de les determinacions bioquímiques en no portadores i portadores d'autoanticossos contra receptors de folat en algun moment de l'embaràs, per les mostres maternes i del cordó.

		Setmanes de gestació				Treball de part	Cordó
		8-12	15	24-27	34		
Folat plasmàtic (nmol/L), mitjana ¹ (DE ²) [N] ³	NP ⁴	31.13 (23.48) [124]	27.19 (15.39) [112]	13.42 (9.38) [117]	11.04 (8.95) [120]	10.33 (7.16) [112]	23.48 (11.36) [112]
	P ⁵	49.72 (30.26)* [8]	33.22 (27.39) [7]	16.27 (15.27) [9]	16.58 (9.52) [7]	15.71 (13.14) [8]	38.55 (19.45)* [9]
Cbl ⁶ plasmàtica (pmol/L), mitjana (DE) [N]	NP	346 (110) [124]	300 (91) [112]	248 (78) [117]	225 (71) [120]	207 (71) [112]	301 (167) [112]
	P	379 (53) [9]	315 (56) [8]	284 (56) [10]	246 (64) [8]	244 (79) [9]	414 (175) [†] [9]
tHcy ⁷ (µmol/L), mitjana (DE) [N]	NP	5.46 (1.14) [124]	4.49 (1.20) [112]	4.74 (1.24) [117]	5.43 (1.26) [120]	6.10 (1.31) [112]	4.97 (1.38) [112]
	P	4.24 (1.18)** [8]	3.90 (0.91) [7]	3.79 (0.64)** [9]	4.33 (0.68)** [7]	5.74 (1.81) [8]	4.97 (1.50) [9]

¹mitjana ajustada per edat gestacional al moment de l'extracció, ²DE: desviació estàndard, ³[N]: número de mostres, ⁴NP: no portadores d'autoanticossos contra receptors de folat, ⁵P: portadores d'autoanticossos contra receptors de folat en algun moment de l'embaràs, ⁶Cbl: cobalamina, ⁷tHcy: homocisteïna plasmàtica total en dejú. S'ha utilitzat la prova U de Mann Whitney; diferent entre NP i P: *p<0.05, **p<0.01, †s'aproxima a la significació (p=0.053).

La condició imprescindible per poder incloure una participant a l'ANOVA de mesures repetides és que s'ha de disposar de totes les mostres maternes. La comparació dels 4 moments de l'embaràs (15, 24-27, 34 setmanes de gestació i treball de part) respecte la mostra del primer trimestre (8-12 setmanes de gestació) suposa una pèrdua de potència estadística degut al baix número de participants (4 portadores i 86 no portadores) que compleixen aquest requisit. El nivell de significació d'aquest anàlisi està expressat a la **FIGURA 28**, on s'han representat les mitjanes de les concentracions de folat plasmàtic, Cbl plasmàtica i tHcy en portadores i no portadores descrites a la **TAULA 13**. El folat plasmàtic, la Cbl plasmàtica i la tHcy tenen un comportament similar en el grup de portadores i de no portadores al llarg de l'embaràs.

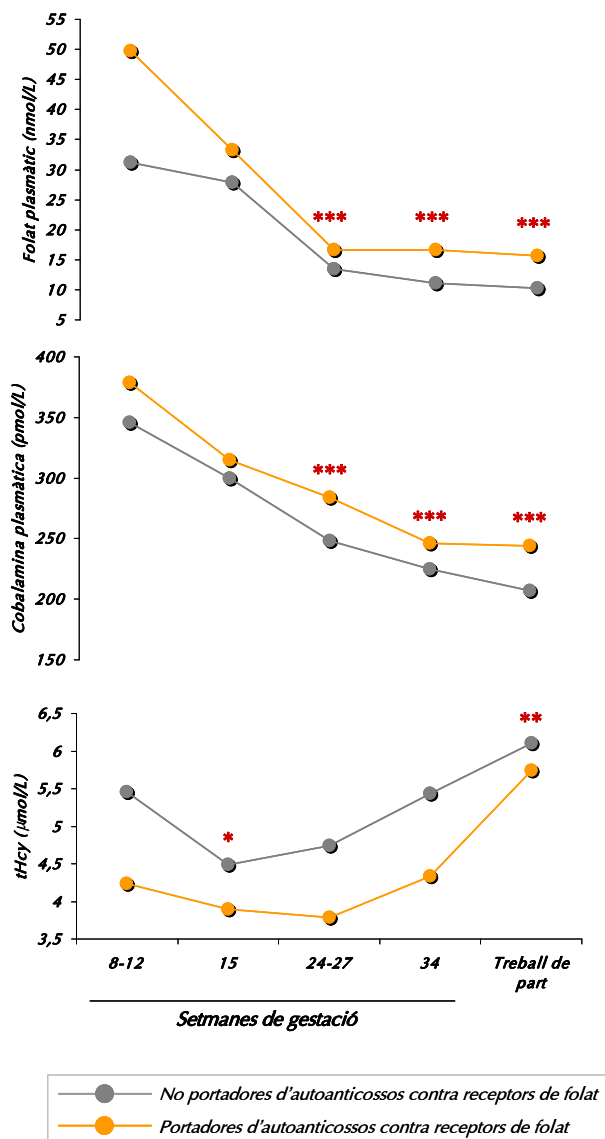


FIGURA 28. Representació de les concentracions mitjanes de folat i cobalamina plasmàtiques i homocisteïna plasmàtica total en dejú de les mostres maternes, en portadores i no portadores d'autoanticossos contra receptors de folat i, nivells de significació de l'ANOVA de mesures repetides.

(Nivells de significació de l'anàlisi de la variància de mesures repetides en 4 portadores i 86 no portadores d'autoanticossos contra RF: * $p < 0.05$ i *** $p < 0.001$ significativament inferior respecte el primer trimestre, ** $p < 0.01$ significativament superior respecte la mostra del primer trimestre)

Els models de regressió lineal estan resumits a la **TAULA 14**. La presència d'autoanticossos contra RF en qualsevol moment de l'embaràs no té efecte significatiu sobre el pes al néixer, no obstant s'associa amb un increment de 12.3 nmol/L en la concentració de folat plasmàtic del cordó respecte a no tenir-ne. Ser portadora d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs tot i que s'associa amb una reducció de la concentració de tHcy al cordó, no és significativa. I la presència d'autoanticossos contra RF al cordó, no s'associa amb la concentració de folat plasmàtic al cordó.

TAULA 14. Resum dels models de regressió lineal múltiple.

Model	Unitats de canvi	F de	R ²
Variable independent	(variable dependent)	Snedecor	
Model 1¹			
Presència autoanticossos contra RF durant l'embaràs	16 g (pes al néixer)	F _{9,56} = 4.1**	0.34
Model 2²			
Presència autoanticossos contra RF durant l'embaràs	12.3 nmol/L** (folat plasmàtic al cordó)	F _{4,126} = 5.5***	0.12
Model 3³			
Presència autoanticossos contra RF durant l'embaràs	- 4% µmol/L (tHcy al cordó)	F _{5,127} = 4.7**	0.13
Model 4⁴			
Presència autoanticossos contra RF al cordó	1.7 nmol/L (folat plasmàtic al cordó)	F _{4,103} = 3.6**	0.09

¹Model ajustat per edat gestacional, gènere del fetus, índex de massa corporal de la mare, edat materna, concentració de cotinina plasmàtica al cordó, ús regular de ferro durant la gestació, consum de suplementes d'àcid fòlic al segon i tercer trimestres d'embaràs, concentració de homocisteïna plasmàtica total al treball de part, ²Model ajustat per edat gestacional, cotinina plasmàtica al cordó i consum d'àcid fòlic al segon i tercer trimestres d'embaràs, ³Model ajustat per edat gestacional, cotinina plasmàtica al cordó, folat plasmàtic al cordó i cobalamina plasmàtica al cordó, ⁴Model ajustat per edat gestacional, cotinina plasmàtica al cordó, consum d'àcid fòlic al segon i al tercer trimestre d'embaràs. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Els resultats dels models de regressió logística, indiquen que la presència d'autoanticossos contra RF en qualsevol moment de la gestació suposa un risc 4.6 vegades major de tenir un nadó amb un pes $\leq P_{25}$; OR: 4.6 (95% IC [1.08-19.85]; $p < 0.05$). Ser portadora d'autoanticossos contra RF en algun moment de la gestació no s'associa a un augment del risc per presentar aquests autoanticossos al cordó. Finalment, el consum d'aliments fortificats / suplementes d'àcid fòlic durant la gestació, no té cap risc sobre la presència d'autoanticossos contra RF.

6. Discussió

La presència d'autoanticossos contra RF en qualsevol moment de l'embaràs és d'un 6.3% i d'un 7.5% al cordó. Recentment hem trobat que un 7.2% d'una mostra representativa de la població adulta de la mateixa zona eren portadors d'autoanticossos contra RF. En 8/9 mostres de cordó amb autoanticossos no s'ha detectat autoanticossos en la mare. La sang de cordó no està afectada per l'hemodilució, condició fisiològica a l'embaràs, que típicament redueix les concentracions de paràmetres sèrics durant l'embaràs. No es pot descartar que això podria dificultar la detecció d'autoanticossos en algunes mares especialment a titulacions baixes.

Ser portadora d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs no es relaciona amb el CIR (definit per sota del P_{10}), però sí que s'observa un risc augmentat (4.6 vegades) de tenir un nadó amb un pes per sota del P_{25} . Un pes al néixer inferior al P_{25} , tot i no ser clínicament diagnosticat com a patològic, podria indicar el no assoliment de la potència òptima de creixement del fetus que correspondria amb la seva constitució genètica. L'anàlisi va ser ajustat per l'IMC matern i altres factors confusors que influeixen sobre la relació. Els resultats del nostre anàlisi aporten evidència de risc de la presència d'autoanticossos materns sobre el pes de naixement del fetus com a indicador del creixement del fetus.

La presència d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs, suposa un increment en 12.3 nmol/L en la concentració de folat plasmàtic del cordó. El fet que

el consum de suplementos vitamínics no era diferent entre el grup de portadores i no portadores, ni a la preconcepció ni durant l'embaràs, indicaria la presència d'un possible mecanisme d'adaptació, per tal de compensar el bloqueig de transport a nivell de RF. Experiments *in vitro* demostren la capacitat de diferents línies cel·lulars a adaptar-se a situacions de deficiència de folat en el medi.²⁸⁵⁻²⁸⁹ Les formes d'adaptació varien des de l'augment de la vida mitjana del mRNA del RF,²⁸⁶ fins a la pèrdua de l'activitat exportadora de folats a favor de la seva acumulació intracel·lular.²⁸⁹ També ha estat descrita la sobreexpressió de RF en línies cel·lulars en condicions de privació de folat.²⁸⁵ A més, s'ha observat que aquest procés és reversible amb una normalització de l'expressió de RF al normalitzar la concentració de folat del medi, a causa de la reorganització de la regió promotora per la producció de transcrits més estables.^{290,291} L'increment d'expressió de RF podria ser el procés d'adaptació utilitzat per contrarestar l'acció dels autoanticossos contra RF. Una altra possibilitat seria una compensació de l'efecte de la inhibició de la ruta del RF per la presència d'autoanticossos afavorint-se altres sistemes de transport.

El RF- α és el que contribueix en major mesura al transport placentari de folats al llarg de l'embaràs. No obstant, també hi ha evidència de l'existència d'altres rutes de transport de folats a nivell placentari. S'ha identificat el PCFT al costat apical de les vellositats de la placenta a terme humana (superfície en contacte amb la sang materna amb funcions de transport).²⁹² El RFC també ha estat localitzat en aquesta superfície i al costat basal. Resultats recents indiquen que les tres vies de transport de folat participen en aquesta funció a la placenta humana a terme.²⁹² Amb l'evolució de la gestació, incrementa la mida de la placenta i del fetus, de manera que també incrementen les seves necessitats pel desenvolupament fetal. De forma paral·lela, incrementa l'expressió dels sistemes de transport de folat a la placenta, tal com demostren Yasuda i els seus col·laboradors (2008)²⁹² en rates gestants. L'expressió a la placenta del RF- α augmenta progressivament i de forma significativa al llarg de l'embaràs, igual succeeix amb el PCFT. Però aquest últim en menor grau i de forma significativa només al final de l'embaràs. El RFC també experimenta un augment significatiu, però al final de l'embaràs la seva expressió és la meitat de l'índex d'expressió del PCFT i molt menys que el RF- α . L'augment observat en la

concentració del folat plasmàtic dels cordons de mares portadores d'autoanticossos podria ser degut a la potenciació del transport de la vitamina per alguna d'aquestes vies.

Tant en portadores com en no portadores d'autoanticossos contra RF, les concentracions de folat i Cbl plasmàtics són superiors al cordó que en la mostra materna del treball de part i, de forma inversa succeeix per la tHcy, tal com ja ha estat descrit anteriorment.^{224,293-296} Els mecanismes de transport de folats de mare a fetus a través de la placenta resulten imprescindibles per assegurar l'aportació nutricional necessària al fetus que està en constant creixement. Per assegurar aquest procés, la placenta té la important funció de concentrar folat a l'espai intervellós.²⁸² Aquest mecanisme assegura la mínima influència de les fluctuacions en les ingestes de folats per part de la mare. La Cbl segueix un patró d'acumulació similar.²⁸³ La concentració de folat a l'espai intervellós és consistent amb les concentracions més elevades de folat als cordons tant en mares suplementades amb àcid fòlic a la gestació com en no suplementades.²⁹³ La suplementació amb àcid fòlic durant l'embaràs però, es reflecteix en els valors de folat plasmàtic materns²⁹⁷ i del cordó²⁹³ com també en els nounats.²⁹⁸ El grup de portadores i no portadores però, no diferien en quant al consum de suplementes vitamínics ni abans ni durant l'embaràs.

El patró de les fluctuacions en tHcy tant en portadores com en no portadores d'autoanticossos va ser l'esperat, seguint una tendència a disminuir fins a mig embaràs²²³ i augmentant a partir de les 34 setmanes.^{224,297} No obstant, la tHcy era significativament inferior al primer trimestre i entre les 24 i les 34 setmanes de gestació en el grup de portadores d'autoanticossos respecte les no portadores. Degut al baix número de participants s'ha perdut la potència estadística necessària per trobar també diferències significatives en els altres punts de l'embaràs estudiats (15 setmanes de gestació i treball de part). Entre els dos grups no hi havia diferències en les freqüències de consum de suplementes d'àcid fòlic ni en la dosi ingerida a la preconcepció ni en cap moment de l'embaràs entre portadores i no portadores (dades no mostrades).

La concentració de folat plasmàtic de les portadores tan sols és significativament més alta que en les no portadores durant el primer trimestre d'embaràs. Factors confusors que podrien causar una concentració mitjana inferior de folat plasmàtic en un grup respecte a l'altre podrien ser l'hemodilució, el consum més freqüent de suplementes d'àcid fòlic i el consum de dosis més altes d'àcid fòlic. Encara que la hemodilució no s'estableix a partir de les 10 setmanes de gestació,²⁹⁹ vàrem ajustar totes les determinacions bioquímiques per l'edat gestacional al moment de recollir la mostra per minimitzar l'efecte d'aquest factor confusor. No hi va haver diferència significativa entre l'edat gestacional de la recollida de la primera mostra entre no portadores i portadores (dades no mostrades).

Havent descartat aquests 2 possibles factors confusors, el millor estat nutricional en folats durant el primer trimestre explicaria la tHcy inferior en les portadores durant el primer trimestre. Tot i que no hi ha diferències significatives en l'estat en folats ni de Cbl plasmàtica entre portadores i no portadores en la resta de l'embaràs, es manté la tendència a concentracions marginalment superiors i de tHcy inferior en les portadores.

La tHcy tot i no ser un biomarcador exclusiu d'estat en folats és molt sensible als canvis d'aquesta vitamina. Les concentracions menors de tHcy indiquen en general un millor estat en folats.³⁰⁰ Es requereix més investigació mitjançant un estudi amb més potència estadística, però el fet de que les portadores tenen tHcy menor a llarg de tot l'embaràs i el fet de que ser portadora s'associa amb un augment en la concentració de folats plasmàtics del cordó, apunta a un possible mecanisme d'adaptació en situació d'embaràs per millorar l'estat en folats.

Anteriorment ha estat descrita la presència d'autoanticossos a les 15-18 setmanes de gestació com un factor de risc per DTN.²²⁰ En aquest moment el procés de tancament del tub neural ha finalitzat. La detecció d'autoanticossos entre les 15-18 setmanes d'embaràs i fins a 14 mesos²¹¹ o anys²⁰⁹ després de l'embaràs afectat per DTN, suggereix que es tracti d'una sensibilització immunitària perdurable en el temps. Cal investigar encara però, per què en uns casos la presència d'aquests autoanticossos es

relaciona amb complicacions d'embaràs tant greus com els DTN i en altres casos no. La magnitud de les titulacions d'autoanticossos i el moment de la seva presència podrien ser factors determinants. A la quarta setmana de gestació quan comença a bategar el cor de l'embrió, el sistema vellositari de la placenta està completament format per proporcionar a l'embrió els nutrients i l'oxigen necessaris pel seu desenvolupament.⁸³ L'expressió dels diferents sistemes de transport a la placenta s'incrementa²⁹² en funció de les necessitats en folats pel desenvolupament de la placenta i del fetus. Fins aleshores, els sistemes de transport de folat presents a l'endometri són els responsables d'aportar el folat necessari pels processos d'embriogènesi. L'efecte de les titulacions altes d'autoanticossos contra RF en aquest període sobre l'estat en folats, no podrà ser compensat de la mateixa manera que ho pot fer a etapes més avançades de l'embaràs en què la placenta ha incrementat l'expressió de RF, RFC i PCFT. L'efecte sobre l'embrió en desenvolupament podria ser molt més greu que en etapes més avançades de l'embaràs. És necessari també estudiar en un futur, l'efecte d'aquests autoanticossos contra RF sobre la formació de la placenta i per tant en els possibles conseqüències directes sobre la funcionalitat de la placenta i indirectament sobre el desenvolupament fetal. El nostre estudi no cobria el desenvolupament de l'embaràs abans de les 8-12 setmanes de gestació.

Es conclou que la presència d'autoanticossos contra RF en qualsevol moment de l'embaràs a partir de les 8 setmanes de gestació fins el treball del part o al cordó, no s'associa significativament a un pitjor estat en folats de la mare (en el curt termini de la durada de la gestació) ni del cordó. Podria existir algun mecanisme d'adaptació per compensar l'efecte del bloqueig del transport dels folats al RF per autoanticossos. Això requereix més investigació. No obstant ser portadora suposa un risc 4.6 vegades major de tenir un nadó per sota del P_{25} respecte no ser portadora d'autoanticossos contra RF.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009



DISCUSSIÓ GENERAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

DISCUSSIÓ GENERAL

Aquesta tesi avança el coneixement sobre els autoanticossos blocants del RF amb diferents aportacions. Es descriu per primera vegada la prevalença d'autoanticossos en una mostra representativa d'una població adulta no exposada a fortificació obligatòria ni suplementació amb àcid fòlic. En aquesta mostra l'estat en folats no està afectat per la presència d'autoanticossos i es confirma que un elevat consum de llet en adults és un factor de risc per la producció d'autoanticossos contra RF. La presència d'autoanticossos contra RF és de naturalesa transitiva i s'associa amb risc de patir subfertilitat en dones. Per contra no es relaciona amb l'AE. La presència d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs o al cordó no s'associa amb el naixement de casos de CIR, tot i que sí amb un risc de no assolir la potència òptima de creixement fetal. L'estat en folats de la mare i del cordó no s'associa amb la presència d'autoanticossos contra RF, probablement per l'existència d'algun mecanisme compensatori pel bloqueig de transport de folats del RF durant l'embaràs.

S'ha observat la presència d'autoanticossos contra RF a la població general en homes i dones adults que estan exposats als efectes derivats del bloqueig del transport de folats a través del RF. Els resultats que hem obtingut no recolzen la hipòtesi de la implicació de la HTL (produïda en situacions de hiperhomocisteïnemia) en la producció d'autoanticossos contra RF.²²¹ Sí que suggereixen que l'elevat consum de llet té algun tipus de paper en la generació d'autoanticossos. En l'estudi d'intervenció de Ramaekers i els seus col·laboradors (2008)²⁰⁵ es va establir l'associació entre el consum de llet i la producció d'autoanticossos en nens malalts amb DFC. El nostre estudi aporta més detalls, sobre aquesta qüestió, amb la quantificació del risc derivat d'un consum elevat de llet entre la població adulta espanyola. Establert aquest risc, a partir d'ara les línies de investigació s'haurien de dirigir a buscar el/els factor/s capaços d'afectar la tolerància immunològica durant la primera etapa de la vida de l'individu, deixant-lo desprotegit de la protecció contra RF de la llet. Tot i que en la nostra població, l'estat en folats no es veu afectat per la presència d'autoanticossos

contra RF, futurs estudis de poblacions amb un consum de llet superior a la nostra podrien investigar si la titulació d'autoanticossos augmenta amb més exposició a la llet i si afecta l'estat en folats.

La presència d'autoanticossos contra RF a la preconcepció s'associa amb el risc de patir subfertilitat en dones. La limitació del nostre estudi, és que només hem considerat el factor femení implicat en el procés de la concepció. L'extensa expressió del RF al tracte genital masculí^{157,168} i en espermatozoides,¹⁷² demostra la important funció que tenen els folats en els processos de producció espermàtica i en la reproducció. Ha estat descrita la millora en el recompte i la mobilitat espermàtica en homes tractats amb 15 mg/d d'àcid folínic durant 3 mesos pel tractament d'infertilitat masculina.³⁰¹ Dos estudis d'intervenció demostraven increments de fins un 74% en el recompte espermàtic tant en homes fèrtils com en subfèrtils amb la suplementació durant 26 setmanes de 5 mg/d d'àcid fòlic i 66 mg/d de sulfat de zinc.^{302,303} En aproximadament el 50% de les parelles subfèrtils l'origen del problema està en l'home. I d'aquests, un 40-60% dels casos són diagnosticats com de causa idiopàtica.³⁰⁴ Els nostres resultats demostren que els homes adults també poden ser portadors d'autoanticossos contra RF. Futurs estudis de parelles amb problemes de infertilitat idiopàtica tindrien que investigar el paper dels autoanticossos contra RF en la fertilitat femenina i masculina. Si es demostrés que la presència d'autoanticossos contra RF fossin una possible causa de infertilitat tant en homes com en dones, mesures profilàctiques dirigides a la població de risc podrien beneficiar aquestes parelles.

No hem trobat cap relació entre la presència d'autoanticossos contra RF i l'AE. El treball anterior²¹² que establia la relació, ho feia amb dones no embarassades en el moment de recollida de la mostra. Tot i haver recollit mostres a la preconcepció, a les 8 setmanes de gestació i, el algun cas a les 20 setmanes de gestació al nostre estudi el número de casos amb autoanticossos era molt baix. Les múltiples causes possibles d'AE, la dificultat de diagnosticar la presència d'un fetus viable per ecografia i obtenir una mostra biològica abans que es produeixi l'avortament, compliquen i alenteixen el reclutament de casos. Seria interessant estudiar la presència d'aquests autoanticossos

al teixit endometrial, placentari i embrionari, recollits en el moment de l'AE, per tal d'establir la possible associació amb la presència d'autoanticossos contra RF.

La presència d'autoanticossos contra RF és de naturalesa transitiva. Aquest resultat només pot confirmar-se durant la preconcepció, ja que durant l'embaràs la seva detecció pot estar condicionada per la hemodilució. Per primera vegada s'avalua la relació de la presència d'autoanticossos contra RF amb complicacions de l'embaràs amb mostres recollides longitudinalment al llarg de l'embaràs, i també en el moment de treball de part i al cordó. Dos dels treballs publicats fins el moment sobre la relació dels autoanticossos contra RF i complicacions de l'embaràs^{209,211} tenen una limitació important en els seus dissenys d'estudi. L'estudi del 2004²⁰⁹ que demostrava per primera vegada la relació dels autoanticossos contra RF amb els DTN, va analitzar mostres de dones amb embaràs previ afectat en la seva majoria. Algunes de les mostres sanguínies van ser recollides fins a anys després de l'embaràs afectat. En el treball de Bliet i els seus col·laboradors²¹¹ havien transcorregut fins a 14 mesos després del part quan es va recollir la mostra sanguínia a les participants. L'inconvenient de no disposar de mostres biològiques abans de què sorgeixi la complicació és que no es pot descartar que no siguin produïts com a conseqüència de la complicació. Només el treball de Cabrera i els seus col·laboradors²²⁰ va estudiar mostres de sang recollides entre les 15-18 setmanes de gestació. Tot i les limitacions descrites, aquests treballs suggereixen una positiva associació entre la presència dels autoanticossos contra RF i complicacions als processos de la reproducció investigats.

L'aparició de casos de CIR no es relaciona amb la presència d'autoanticossos en algun moment de l'embaràs, però sí el risc de no assolir el potencial de desenvolupament fetal adequat. No obstant el mecanisme no està clar. No hem trobat relació entre la presència d'aquests autoanticossos en algun moment de l'embaràs amb l'estat en folats ni de la mare ni del cordó, però sí que es va observar un augment significatiu de la concentració de folat plasmàtic al cordó. Molt probablement existeixi un mecanisme d'adaptació que compensi l'efecte del bloqueig del transport de folats. No obstant no hi ha evidència de que l'increment de concentració hagi

afavorit el desenvolupament fetal. Un excés en folats, pot induir un desequilibri de la metilació de l'ADN³⁰⁵ i afectar el desenvolupament fetal. Si l'augment en l'estat en folats del cordó fos beneficiós pel desenvolupament fetal, la presència d'autoanticossos no hauria estat un risc per tenir un pes de naixement inferior al P₂₅. Seria interessant estudiar en profunditat l'efecte de la presència d'autoanticossos sobre la formació de la placenta, i en definitiva la seva funcionalitat, en els casos de nounats amb un pes al néixer clínicament no diagnosticat com patològic, però que tampoc han assolit el desenvolupament òptim esperat.

La presència d'autoanticossos contra RF no es relaciona amb l'evolució de l'estat en folats al llarg de l'embaràs. Només es descriu una concentració de folat plasmàtic significativament més elevada entre les portadores d'autoanticossos durant el primer trimestre respecte les no portadores, que no pot explicar-se per la influència de factors confusors com l'ús de suplementos. Seria necessari dissenyar un estudi que contemplés la recollida de mostres sanguínies maternes abans de les 8 setmanes de gestació, per tal d'esclarir una possible relació entre la presència d'autoanticossos i l'estat en folats durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari.

Finalment, aquesta tesi aporta resultats addicionals que no van ser objectiu d'estudi en aquesta tesi, però que aporten informació des del punt de vista de la salut pública. Gairebé un terç de les participants (34%) de l'Estudi NUTCIR (el més actual) van consumir suplementos d'àcid fòlic a la preconcepció comparat amb el 8%⁹⁷ i el 13%³⁰⁶ descrit en treballs espanyols anteriors. Probablement aquesta diferència sigui deguda a l'origen de les voluntàries del nostre estudi. Les voluntàries que vam reclutar no representen la població general. Part de les reclutades van ser derivades als serveis d'alt risc obstètric dels dos hospitals per antecedents de complicacions d'embaràs prèvies. La resta eren treballadores de la mateixa empresa hospitalària i dones que accedien directament al control de l'embaràs a l'hospital enlloc del seguiment habitual a l'Assistència Primària. El criteri d'exclusió de gestants de més de 12 setmanes d'embaràs dificulta el reclutament d'una mostra més representativa de la població pel factor limitant de la rogramació de la primera visita antenatal. El disseny de l'estudi NUTCIR, explica l'alt percentatge de dones que van consumir suplementos

d'àcid fòlic durant el primer trimestre d'embaràs (92%). Aquest demostra l'alt índex de compliment de tractament profilàctic recomanat pel ginecòleg a la primera visita antenatal que pel disseny de l'estudi era abans d'acabar el primer trimestre de gestació. Aquest percentatge no serà representatiu de la població, ja que totes aquelles dones que tenen la primera visita antenatal després del primer trimestre d'embaràs no hauran rebut les recomanacions del seu ginecòleg sobre la suplementació. Al treball de Coll i col·laboradors (2004),⁹⁷ es descriu que només un 6.3% van prendre suplementes d'àcid fòlic durant el període aconsellat (4 setmanes abans i 4 després de la concepció), un 18% en l'estudi de Gibert i col·laboradors (2003)³⁰⁶ (període periconcepcional definit com un mes abans de la gestació i durant els 3 mesos següents a la concepció), i 52%³⁰⁷ en un estudi holandès (4 setmanes abans i després de la concepció). Els estudis amb població espanyola, registren un percentatge de suplementació encara molt inferior a la d'altres països europeus. Els nostres resultats confirmen que la planificació de l'embaràs repercuteix en el consum de suplementes d'àcid fòlic a la preconcepció, i per tant pot afavorir l'estat nutricional en folats tal com ja s'ha demostrat anteriorment.³⁰⁸ Però tot i que entre les nostres participants el 78.5% van afirmar haver planificat l'embaràs, només el 34% van prendre suplementes d'àcid fòlic a la preconcepció. Per tant encara existeix la necessitat de buscar fórmules i estratègies més efectives per potenciar la profilaxis periconcepcional dels DTN amb àcid fòlic.

S'obrirà la nova línia d'investigació durant les primeres etapes de desenvolupament embrionari amb el treball de recerca postdoctoral "Folate deficiency and folate receptor antibody in brain development and behaviour" sol·licitat a la convocatòria Beatriu Pinós de la AGAUR (resolució pendent per abril 2009).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009



CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

CONCLUSIONS

- La prevalença d'individus portadors d'autoanticossos contra RF en una mostra representativa d'una població mediterrània espanyola és del 7.2%.
- La presència d'autoanticossos contra RF amb una titulació mitjana de 0.3 pmol RF blocat/mL en una mostra representativa d'una població mediterrània espanyola no afecta l'estat en folats ni tHcy de la població.
- Els consumidors de llet del quintil més alt (entre 307-1247 g/dia) de la població tenen 2.4 vegades més risc de ser portadors d'autoanticossos comparat amb la resta de la població.
- Els autoanticossos contra els RF poden presentar-se de forma transitiva durant la preconcepció.
- Les dones que al període preconcepcional són portadores d'autoanticossos contra RF, tenen un risc 12 vegades superior de patir subfertilitat respecte les que no.
- No es va detectar autoanticossos contra RF en cap mostra sanguínia recollida de forma prospectiva de les participants que van patir un avortament espontani.
- La prevalença de portadores d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs en la mostra estudiada és d'un 6.3%.
- La prevalença d'autoanticossos contra RF al cordó és d'un 7.5%.
- La presència d'autoanticossos contra RF en qualsevol moment de l'embaràs no té cap efecte sobre l'estat en folats de la mare.
- Ser portadora d'autoanticossos contra RF s'associa amb un augment en 12.3 nmol/L de folat plasmàtic del cordó respecte a no ser portadora.
- Les dones portadores d'autoanticossos contra RF en algun moment de l'embaràs tenen un risc 4.6 vegades superior de tenir un nadó amb un pes al néixer per sota del P₂₅ respecte les no portadores.
- La presència d'autoanticossos contra RF al cordó, no s'associa amb la concentració de folat plasmàtic al cordó.

- El folat plasmàtic, la Cbl plasmàtica i la tHcy tenen un comportament similar en el grup de portadores i de no portadores d'autoanticossos al llarg de l'embaràs.



REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Chandler CJ, Wang TT, Halsted CH. Pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal brush borders. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1986;261:928-33.
2. Wang TT, Chandler CJ, Halsted CH. Intracellular pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal mucosa. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 1986;261:13551-5.
3. Rawlings ND, Barrett AJ. Structure of membrane glutamate carboxypeptidase. *Biochim Biophys Acta* 1997;1339:247-52.
4. Barinka C, Hlouchova K, Rovenska M, Majer P, Dauter M, Hin N, et al. Structural basis of interactions between human glutamate carboxypeptidase II and its substrate analogs. *J Mol Biol* 2008;376:1438-50.
5. Halsted CH. Jejunal brush-border folate hydrolase. A novel enzyme. *West J Med* 1991;155:605-9.
6. Antony AC. The biological chemistry of folate receptors. *Blood* 1992;79:2807-20.
7. Matherly LH, Goldman ID. Membrane transport of folates. *Vitam Horm* 2003;66:403-56.
8. Gregory III JF. The bioavailability of folate. A: Bailey LB, editor. *Folate in health and disease*. New York: Marcel Dekker, Inc; 1995. p.195-235.
9. Kelly P, McPartlin J, Goggins S, Weir DG, Scott JM. Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1790-5.
10. Ashokkumar B, Mohammed ZM, Vaziri ND, Said HM. Effect of folate oversupplementation on folate uptake by human and renal epithelial cells. *Am J Clin Nutr* 2007;86:159-66.
11. Nakai Y, Inoue K, Abe N, Hatakeyama M, Ohta K, Otagiri M, et al. Functional characterization of human proton-coupled folate transporter/heme carrier protein 1 heterologously expressed in mammalian cells as a folate transporter. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:469-76.
12. Soliman HA, Olesen H. Folic acid binding by human plasma albumin. *Scand J Clin Lab Invest* 1976;36:299-304.
13. Brody T, Shane B. Folic acid. A: Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, Machlin LJ, editors. *Handbook of vitamins*. 3a ed.. New York: Marcel Dekker, Inc; 2001. p.427-462.
14. Birn H. The kidney in vitamin B₁₂ and folate homeostasis: characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F22-36.
15. Gregory JF 3rd. Bioavailability of folate. *Eur J Clin Nutr* 1997;51(Suppl 1):S54-S9.
16. Melse-Boonstra A, Verhoef P, West C. Quantifying folate bioavailability: a critical appraisal of methods. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7:539-45.
17. Sanderson P, McNulty H, Mastroiacovo P, McDowell IF, Melse-Boonstra A, Finglas PM, et al. Folate bioavailability: UK Food Standards Agency workshop report. *Br J Nutr* 2003;90(2):473-9.
18. McNulty H, Pentieva K. Folate bioavailability. *Proc Nutr Soc* 2004;63(4):529-36.
19. Melse-Boonstra A, West CE, Katan KB, Kok FJ, Verhoef P. Bioavailability of heptaglutamyl relative to monoglutamyl folic acid in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 2004;79:424-9.
20. van het Hof KH, Tijburg LB, Pietrzik K, Weststrate JA. Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix. *Br J Nutr* 1999;82:203-12.
21. Seyoum E, Selhub J. Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase action. *J Nutr* 1998;128:1956-60.
22. Wei MM, Gregory JF 3rd. Organic acids in selected foods inhibit intestinal brush border pteroylpolyglutamate hydrolase in vitro: potential mechanism affecting the

bioavailability of dietary polyglutamyl folate. *J Agric Food Chem* 1998;46:211-9.

23. Jones ML, Nixon PF. Tetrahydrofolates are greatly stabilized by binding to bovine milk folate-binding protein. *J Nutr* 2002;132:2690-4.

24. Devlin AM, Ling E, Peerson JM, Fernando S, Clarke R, Smith AD, et al. Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia. *Hum Mol Genet* 2000;9:2837-44.

25. Vargas-Martinez C, Ordovas JM, Wilson PW, Selhub J. The glutamate carboxypeptidase gene II (C>T) polymorphism does not affect folate status in the Framingham Offspring cohort. *J Nutr* 2002;132:1176-9.

26. McKillop DJ, Pentieva K, Daly D, McPartlin JM, Hugues J, Strain JJ, et al. The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are among the major contributors to folate intake in the UK diet. *Br J Nutr* 2002;88:681-8.

27. Melse-Boonstra A, de Bree A, Verhoef P, Bjørke-Monsen AL, Verschuren WM. Dietary monoglutamate and polyglutamate folate are associated with plasma folate concentrations in Dutch men and women aged 20-65 years. *J Nutr* 2002;132:1307-12.

28. Cuskely GJ, McNulty H, Scott JM. Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: implications for prevention on neural tube defects. *Lancet* 1996;347:657-9.

29. Pfeiffer CM, Rogers LM, Bailey LB, Gregory JF 3rd. Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. *Am J Clin Nutr* 1997;66:1388-97.

30. Sauberlich HE, Kretsch MJ, Skala JH, Johnson HL, Taylor PC. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am J Clin Nutr* 1987;46:1016-28.

31. Food standards: amendment of standards of identify for enriched grain products to require addition of folic acid. *Fed Regist* 1996;61:8781-97.

32. Milne DB, Johnson LAK, Mahalko JR, Sandstead HH. Folate status of adult males living in a metabolic unit: possible relationships with iron nutriture. *Am J Clin Nutr* 1983;37:768-73.

33. Jacob RA, Wu MM, Henning SM, Swendseid ME. Homocysteine increases as folate decreases in plasma of health men during short-term dietary folate and methyl group restriction. *J Nutr* 1994;124:1072-80.

34. O'Keefe CA, Bailey LB, Thomas EA, Hofler SA, Davis BA, Cerda JJ, et al. Controlled dietary folate affects folate status in nonpregnant women. *J Nutr* 1995;125:2217-25.

35. Caudill MA, Cruz AC, Gregory JF 3rd, Hutson AD, Bailey LB. Folate status response to controlled folate intake in pregnant women. *J Nutr* 1997;127:2363-70.

36. Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, James J, Pogribny IP, Miller BJ, et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J Nutr* 1998;128:1204-12.

37. Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. National Academy of Sciences. Subcommittee on Folate, Other B vitamins, and Choline. Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Panthothenic Acid, Biotin and Choline. Washington, DC: National Academy Press; 1998.

38. Suitor CW, Bailey LB. Dietary folate equivalents: interpretation and application. *J Am Diet Assoc* 2000;100:88-94.

39. Olivares Martínez AB, Ros Berruezo G, Bernal Cava MJ, Martínez Graciá G, Castón-Periago MJ. Estimación de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico en alimentos. *Arch Latinoam Nutr* 2005;55:5-14.

40. Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, Meyboom S, Thomas CM, Duran M, et al. Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J Nutr* 1999;129:1135-9.

41. Winkels RM, Brouwer IA, Siebelink E, Katan MB, Verhoef P. Bioavailability of food

- folates in 80% of that of folic acid. *Am J Clin Nutr* 2007;85:465-73.
- 42.** Drogan D, Klipstein-Grobusch K, Dierkes J, Weikert C, Boeing H. Dietary intake of folate equivalents and risk of myocardial infarction in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Postdam study. *Public Health Nutr* 2006;9:465-71.
- 43.** Carmel R, Jacobsen DW Editors. *Homocysteine in health and disease*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001.
- 44.** Mathews RG, Ludwig ML. Microbiological modelling of human disease: homocysteine metabolism. A: *Homocysteine in health and disease*. Carmel R, Jacobsen DW Editors. Cambridge: Cambridge University Press; 2001. p.100-112.
- 45.** Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Mathews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
- 46.** Yamada K, Chen Z, Rozen R, Mathews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Nat Acad Sci USA* 2001;98:14853-8.
- 47.** Stern LL, Shane B, Bagley PJ, Nadeau M, Shih V, Selhub J. Combined marginal folate and riboflavin status affect homocysteine methylation in cultured immortalized lymphocytes from persons homozygous for the MTHFR C677T mutation. *J Nutr* 2003;133:2716-20.
- 48.** Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjørke-Monsen AL, Schneede J. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem* 2000;46:1065-71.
- 49.** Moat SJ, Ashfield-Watt PA, Powers HJ, Newcombe RG, McDowell IF. Effect of riboflavin status on the homocysteine-lowering effect of folate in relation to the MTHFR (C677T) genotype. *Clin Chem* 2003;49:295-302.
- 50.** Hustad S, Midttum Ø, Schneede J, Vollset SE, Grotmol T, Ueland PM. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism as a modulator of a B vitamin network with major effects on homocysteine metabolism. *Am J Hum Genet* 2007;80:846-55.
- 51.** Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem* 1997;272:3628-34.
- 52.** Banerjee RV, Mathews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB J* 1990;4:1450-9.
- 53.** Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood* 1999;93:4059-70.
- 54.** Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999;19:217-46.
- 55.** Garrow TA. Betaine-dependent remethylation. A: *Homocysteine in health and disease*. Carmel R, Jacobsen DW Editors. Cambridge: Cambridge University Press; 2001. p.145-152.
- 56.** Holm PI, Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Grotmol T, Schneede J. Modulation of the homocysteine-betaine relationship by methylenetetrahydrofolate reductase 677 C->T genotypes and B-vitamin status in a large-scale epidemiological study. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1535-41.
- 57.** Jhee KH, Kruger WD. The role of cystathionine beta-synthase in homocysteine metabolism. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:813-22.
- 58.** Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr* 2006;136(Suppl 6):1636S-40S.
- 59.** Gellekink H, den Heijer M, Heil SG, Blom HJ. Genetic determinants of plasma total homocysteine. *Semin Vasc Med* 2005;5:98-109.
- 60.** Verhoef P, de Groot LC. Dietary determinants of plasma homocysteine concentrations. *Semin Vasc Med* 2005;5:110-23.
- 61.** Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV. Reduced rate of DNA replication fork movement in megaloblastic anemia. *J Clin Invest* 1980;65:26-36.

62. Bain BJ. Morphology in the diagnosis of red cell disorders. *Hematology* 2005;10 Suppl 1:178-81.
63. Vives JLI, Aguilar JLI. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 2ª ed. Barcelona: Masson; 1996. Series manuales espiral. P.343-360.
64. Murphy MM, Scott JM, Molloy AM, Arija V, Ceruelo S, Berrocal M, Salat J, Fernández-Ballart J. Determinants of total fasting plasma homocysteine (tHcy) in a randomly selected representative sample of a population unexposed to B-vitamin fortification or supplementation. A: FASEB Summer Research Conference. Folic Acid, Vitamin B12 and One Carbon Metabolism. Indian Wells, California (Estats Units); 2006.
65. Refsum H, Ueland PM, Nygård O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann Rev Medicine* 1998;49:31-62.
66. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tuerdal A, Gjessing HK, et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 2000;71:962-8.
67. Murphy MM. Homocysteine: biomarker or cause of adverse pregnancy outcome?. *Biomarkers Med* 2007;1:145-57.
68. Wu LL, Wu JT. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker. *Clin Chim Acta* 2002;322:21-8.
69. Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 1999;55:578-92.
70. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 2000;130:129-32.
71. Duthie SJ, Narayanan S, Brand GM, Pirie L, Grant G. Impact of folate deficiency on DNA stability. *J Nutr* 2002;132 (8 Suppl):2444S-9S.
72. Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *J Nutr* 2002;132(8 Suppl):2382S-7S.
73. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4632-42.
74. Oommen AM, Griffin JB, Sarath G, Zemleni J. Roles for nutrients in epigenetic events. *J Nutr Biochem* 2005;16:74-7.
75. Duthie SJ, McMillan P. Uracil misincorporation in human DNA detected using single cell gel electrophoresis. *Carcinogenesis* 1997;18:1709-14.
76. Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:849-53.
77. Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5606-11.
78. Jang H, Mason JB, Choi SW. Genetic and epigenetic interactions between folate and aging in carcinogenesis. *J Nutr* 2005;135(12 Suppl):2967S-71S.
79. Choi SW, Friso S. Interactions between folate and aging for carcinogenesis. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1151-7.
80. Hibbard ED, Smithells RW. Folic acid metabolism and embryopathy. *Lancet* 1965;1:1254-6.
81. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 1976;51:944-50.
82. Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 1993;86:703-8.
83. Salter TW. Lagman Embriología médica. Con orientación clínica. 9a Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 2004.
84. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-tube defects. *N Engl J Med*. 1999;341:1509-19.
85. van der Linden IJ, Afman LA, Heil SG, Blom HJ. Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk. *Proc Nutr Soc* 2006;65:204-15.

- 86.** Chen CP. Syndromes, disorders and maternal risk factors associated with neural tube defects (IV). *Taiwan J Obstet Gynecol* 2008;47:141-50.
- 87.** MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991;338:131-7.
- 88.** Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327:1832-5.
- 89.** Eichholzer M, Tönz O, Zimmermann R. Folic acid: a public-health challenge. *Lancet*. 2006;367:1352-61.
- 90.** Sillender M, Pring DW. How effective was the health education authority's folic acid campaign?. *J Obstet Gynaecol* 2000;20:271-6.
- 91.** Van der Pal-de Bruin KM, de Walle HE, Jeeninga W, de Rover C, Cornel MC, de Jong-van den Berg LT, et al. The Dutch 'Folic acid campaign' – have the goals been achieved?. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2000;14:111-7.
- 92.** Bower C, Eades S, Payne J, D'Antoine H, Stanley F. Trends in neural tube defects in Western Australia in Indigenous and non-Indigenous populations. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2004;18:277-80.
- 93.** Bower C, Miller M, Payne J, Serna P. Promotion of folate for the prevention of neural tube defects: who benefits? *Paediatric Perinat Epidemiol* 2005;19:435-44.
- 94.** Ray JC, Singh G, Burrows RF. Evidence for suboptimal use of periconceptional folic acid supplements globally. *BJOB* 2004;111:399-408.
- 95.** Weller MM, Louick C, Mitchell AA. Achieving a public health recommendation for preventing neural tube defects with folic acid. *Am J Public Health* 1999;89:1637-40.
- 96.** Bower C. Primary prevention of neural tube defects with folate in Western Australia: the value of the Western Australian Birth Defects Registry. *Congenit Anom (Kyoto)* 2006;46:118-21.
- 97.** Coll O, Pisa S, Palacio M, Quintó L, Cararach V. Awareness of the use of folic acid to prevent neural tube defects in a Mediterranean area. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;115:173-7.
- 98.** Hertrampf E, Cortés F, Erickson JD, Cayazzo M, Freire W, Bailey LB, et al. Consumption of folic acid-fortified bread improves of reproductive age in Chile. *J Nutr* 2003;133:3166-9.
- 99.** Persad VL, van den Hof MC, Dubé JM, Zimmer P. Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification. *CMAJ* 2002;167:241-5.
- 100.** Lawrence M. Challenges in translating scientific evidence into mandatory food fortification policy: an antipodean case study of the folate – neural tube defect relationship. *Public Health Nutr* 2005;8:1235-41.
- 101.** Lawrence M. Mandatory fortification with folic acid. What would Hippocrates say?. *Aust Fam Physician* 2007;36:69-73.
- 102.** CDC-Centers for Disease Control and Prevention. Trends in wheat-flour fortification with folic acid and iron – worldwide, 2004 and 2007. *MMWR* 2008;57:8-10.
- 103.** Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LY. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA*. 2001;285:2981-6.
- 104.** Williams LJ, Mai CT, Edmonds LD, Shaw GM, Kirby RS, Hobbs CA, et al. Prevalence of spina bifida and anencephaly during the transition to mandatory folic acid fortification in the United States. *Teratology* 2002;66:33-9.
- 105.** Williams LJ, Rasmussen SA, Flores A, Kirby RS, Edmonds LD. Decline in the prevalence of spina bifida and anencephaly by race/ethnicity: 1995-2002. *Pediatrics* 2005;116:580-6.
- 106.** Castilla EE, Orioli IM, López-Camelo JS, Dutra MdaG, Nazer-Herrera J, Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations (ECLAMC). Preliminary data on changes in neural tube defect prevalence rates after folic acid fortification in South America. *Am J Med Genet Nutr A* 2003;123:123-8.

- 107.** López-Camelo KS, Orioli IM, da Graça Dutra M, Nazer-Herrera J, Rivera N, Ojeda ME, et al. Reduction of birth prevalence rates of neural tube defects after folic acid fortification in Chile. *Am J Med Genet A* 2005;135:120-5.
- 108.** Corral E, Moreno R, Pérez G, Ojeda ME, Valenzuela H, Reascos M, et al. Defectos congénitos cráneo-encefálicos: variedades y respuesta a la fortificación de la harina con ácido fólico. *Rev Méd Chile* 2006;134:1129-34.
- 109.** Nazer J, Cifuentes L, Aguila A, Huárez ME, Cid MP, Godoy ML, et al. Efecto de la fortificación de la harina con ácido fólico sobre la evolución de las tasas de prevalencia al nacimiento de malformaciones congénitas en los hospitales chilenos del ECLAMC *Rev Med Chil* 2007;135:198-204.
- 110.** Chen LT, Rivera MA. The Costa Rican experience: reduction of neural tube defects following food fortification programs. *Nutr Rev* 2004;62:S40-S3.
- 111.** Ray JG, Meier C, Vermeulen MJ, Boss S, Wyatt PR, Cole DE. Association of neural tube defects and folic acid food fortification in Canada. *Lancet* 2002;360:2047-8.
- 112.** Liu S, West R, Randell E, Longerich L, O'Connor KS, Scott H, et al. A comprehensive evaluation of food fortification with folic acid for the primary prevention of neural tube defects. *BMC Pregnancy Childbirth* 2004;4:20.
- 113.** de Walls P, Tairou F, Van Allen MI, Uh SH, Sibbald B, Evans JA, et al. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *N Engl J Med* 2007;357:135-42.
- 114.** Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PWF, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999;340:1449-54.
- 115.** Kim MK, Ordovas JM, Selhub J, Campos H. B vitamins and plasma homocysteine concentrations in an urban and rural area of Costa Rica. *J Am Coll Nutr* 2003;22:224-31.
- 116.** Hertrampf E, Cortés F. Folic acid fortification of wheat flour: Chile. *Nutr Rev* 2004;62:S44-8.
- 117.** Ray JG. Folic acid fortification in Canada. *Nutr Rev* 2004;62:S35-S9.
- 118.** Pfeiffer CM, Caudill SP, Gunter EW, Osterloh J, Sampson EJ. Biochemical indicators of B vitamins status in the US population after folic acid fortification: results from de National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Am J Clin Nutr* 2005;82:442-50.
- 119.** Ganji V, Kafai MR. Trends in serum folate, red blood cell folate, and circulating total homocysteine concentrations in the United States: analysis of data from National Health and Nutrition Examination Surveys, 1988-1994, 1999-2000 and 2001-2002. *J Nutr* 2006;136:153-8.
- 120.** Pfeiffer CM, Johnson CL, Jain RB, Yetley EA, Picciano MF, Rader JL, et al. Trends in blood folate and vitamin B-12 concentrations in the United States, 1988-2004. *Am J Clin Nutr* 2007;86:718-27.
- 121.** Pfeiffer CM, Osterloh JD, Kennedy-Stephenson J, Picciano MF, Yetley EA, Rader JL, et al. Trends in circulating concentrations of total homocysteine among US adolescents and adults: findings from the 1991-1994 and 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Surveys. *Clin Chem* 2008;54:801-13.
- 122.** Quinlivan EP, McPartlin J, McNulty H, Ward M, Strain JJ, Weir DG, Scott JM. Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease. *Lancet* 2002;359:227-8.
- 123.** Hoey L, McNulty H, Askin N, Dunne A, Ward A, Pentieva K, et al. Effect of a voluntary food fortification policy on folate, related B vitamins status, and homocysteine in health adults. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1405-13.
- 124.** Hannon EM, Kiely M, Flynn A. The impact of voluntary fortification of foods on micronutrient intakes in Irish adults. *Br J Nutr* 2007;97:1177-86.
- 125.** Finglas PM, de Meer K, Molloy A, Verhoef P, Pietrzik K, Powers HJ, et al. Research goals for folate and related B vitamin in Europe. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:287-94.

- 126.** French AE, Grant R, Weitzman S, Ray JG, Vermeulen MJ, Sung L, et al. Folic acid fortification is associated with a decline in neuroblastoma. *Clin Pharmacol Ther* 2003;74:288-94.
- 127.** Giovannucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *J Nutr* 2002;132:2350S-5S.
- 128.** Kim YI. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer?. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1123-8.
- 129.** Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo. Recomendaciones sobre suplementación con ácido fólico para la prevención de defectos del tubo neural. *Inf Ter Sist Nac Salud* 1996;20:91-2.
- 130.** Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo. Recomendaciones sobre suplementación con ácido fólico para la prevención de defectos del tubo neural. *Inf Ter Sist Nac Salud* 1998;22:150-1.
- 131.** Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo. Recomendaciones sobre suplementación con ácido fólico para la prevención de defectos del tubo neural. *Inf Ter Sist Nac Salud* 2001;25:66-7.
- 132.** van den Boom A, Serra-Majem LI, Ribas L, Ngo J, Pérez-Rodrigo C, Aranceta J, et al. The contribution of ready to eat cereals to daily nutrient intake and breakfast quality in a Mediterranean setting. *J Am Coll Nutr* 2006;25:135-43.
- 133.** Matherly LH. Molecular and cellular biology of the lumen reduced folate carrier. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;67:131-61.
- 134.** Matherly LH, Hou Z. Structure and function of the reduced folate carrier: a paradigm of a major dactilator superfamily mammalian nutrient transporter. *Vitam Horm*. 2008;79:145-83.
- 135.** Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 2006;127:917-28.
- 136.** Sirotnak FM, Tolner B. Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells. *Ann Rev Nutr* 1999;19:91-122.
- 137.** Matherly LH, Hou Z, Deng Y. Human reduced folate carrier: translocation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:111-8.
- 138.** Dixon KH, Lampher BC, Chiu J, Kelley K, Cowan KH. A novel cDNA restores reduced folate carrier activity and methotrexate sensitivity to transport deficient cells. *J Biol Chem* 1994;269:17-20.
- 139.** Chiao JH, Roy K, Tolner K, Yang CH, Sirotnak FM. RFC-1 gene expression regulates absorption in mouse small intestine. *J Biol Chem* 1997;272:11165-70.
- 140.** Balamurugan K, Said HM. Role of reduced folate carrier in intestinal folate uptake. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;22:C189-93.
- 141.** Horne DW, Reed KA. Transport of methotrexate into PC-3 human prostate cancer cells. *Arc Biochem Biophys* 2001;394:39-44.
- 142.** Yang CH, Pain J, Sirotnak FM. Alteration of folate analogue transport inward after induced maturation of HL-60 leukemia cells. Molecular properties of the transporter in a overproducing variant and evidence for down-regulation of its synthesis in maturing cells. *J Biol Chem* 1992;267:6628-34.
- 143.** Wong SC, Zhang L, Proefke SA, Matherly LH. Effects of the loss of capacity for N-glycosylation on the transport activity and cellular localization of the human reduced folate carrier. *Biochim Biophys Acta* 1998;1375:6-12.
- 144.** Moscow JA, Gong M, He R, Sgagias MK, Dixon SL, Anzick SL, et al. Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995;55:3790-4.
- 145.** Wong SC, Proefke SA, Bhushan A, Matherly LH. Isolation of human cDNAs that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate

- transport-defective Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1995;270:17468-75.
- 146.** Prasad PD, Ramamoorthy S, Leibach FH, Ganapathy V. Molecular cloning of the human placental folate transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;206:681-7.
- 147.** Williams FMR, Flintoff WF. Isolation of a human cDNA that complements a mutant hamster cell defective in methotrexate uptake. *J Biol Chem* 1995;270:2987-92.
- 148.** Nguyen TT, Dyer DL, Dunning DD, Rubin SA, Grant KE, Said HM. Human intestinal folate transport: cloning, expression, and distribution of complementary RNA. *Gastroenterology* 1997;112:783-91.
- 149.** Tolner B, Roy K, Sirotnak FM. Structural analysis of the human RFC-1 gene encoding a folate transporter reveals multiple promoters and alternatively spliced transcripts with 5' end heterogeneity. *Gene* 1998;211: 331-41.
- 150.** Zhang L, Wong SO, Matherly LH. Transcript heterogeneity of the human reduced folate carrier results from the use of multiple promoters and variable splicing of alternative upstream exons. *Biochem J* 1998;332:773-80.
- 151.** Kamen BA, Caston JD. Purification of folate binding factor in normal umbilical cord serum. *Proc Nat Acad Sci USA* 1975;72:4261-4.
- 152.** Holm J, Hansen SI, Lyngbye J. Cofactor in serum for high-affinity folate binding in milk. *Clin Chem* 1980;26:1591-2.
- 153.** Henderson GB. Folate-binding proteins. *Annu Rev Nutr* 1990;10:319-35.
- 154.** Antony AC. Folate receptors. *Annu Rev Nutr* 1996;16:501-21.
- 155.** Waxman S, Schreiber C. Characteristics of folic acid-binding protein in folate-deficient serum. *Blood* 1973;42:291-301.
- 156.** Verma RS, Antony AC. Immunoreactive folate-binding proteins from human saliva. *Biochem J* 1992;286:707-15.
- 157.** Holm J, Hansen SI, Høier-Mandsen M. A high-affinity folate binding protein in human semen. *Biosci Rep* 1991;11:237-42.
- 158.** Retief FP, Huskisson YJ. Folate binders in body fluids. *J Clin Pathol* 1970;23:703-7.
- 159.** Antony AC, Utley C, Marcell PD, Kolhouse JF. Isolation, characterization, and comparison of the solubilized particulate and soluble folate binding proteins from human milk. *J Biol Chem* 1982;257:10081-9.
- 160.** Salter DN, Scott JK, Slade H, Andrews P. The preparation and properties of folate binding protein from cow's milk. *Biochem J* 1981;193:469-76.
- 161.** Rubinoff M, Scheriber C, Waxman S. The isolation and characterization of the folate binding protein from goat milk. *FEBS Lett* 1977;72:244-48.
- 162.** Luhrs CA, Pitiranggon P, da Costa M, Rothenberg SP, Slomiany BL, Brink L, et al. Purified membrane and soluble folate binding from cultured KB cells have similar amino acid compositions and molecular weights but differ in fatty acid acylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;84:6546-9.
- 163.** Lacey SW, Sanders JM, Rothberg KG, Anderson RG, Kamen BA. Complementary DNA for the folate binding protein correctly predicts anchoring to the membrane by glycosyl-phosphatidylinositol. *J Clin Invest* 1989;84:715-20.
- 164.** Luhrs CA, Slomiany BL. A human membrane-associated folate binding protein is anchored by a glycosyl-phosphatidylinositol tail. *J Biol Chem* 1989;264:21446-9.
- 165.** Elwood PC, Deutsch JC, Kolhouse JF. The conversion of the human membrane-associated folate-binding protein (folate receptor) to the soluble folate binding protein by a membrane-associated metalloprotease. *J Biol Chem* 1991;266:2346-53.
- 166.** Elwood PC. Molecular cloning and characterization of the human folate-binding protein cDNA from placenta and malignant tissue culture (KB) cells. *J Biol Chem* 1989;264:14893-901.
- 167.** Sadasivan E, Rothenberg SP. The complete amino acid sequence of a human folate binding protein from KB cells determined from the cDNA. *J Biol Chem* 1989;264:5806-11.
- 168.** Holm J, Hansen SI, Høier-Mandsen M, Bostad L. High-affinity folate binding in human choroid plexus. *Biochem J* 1991;280:267-71.

- 169.** Weitman SD, Weinberg AG, Coney LR, Zurawski VR, Jennings DS, Kamen BA. Cellular localization of the folate receptor: potential role in drug toxicity and folate homeostasis. *Cancer Research* 1992;52:6708-11.
- 170.** Weitman SD, Lark RH, Coney LR, Fort DW, Frasca V, Zurawski VR, et al. Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer Research* 1992;52:3396-401.
- 171.** Antony AC, Utley C, Van Horne KC, Kolhouse JF. Isolation and characterization of a folate receptor from human placenta. *J Biol Chem* 1981;256:9684-92.
- 172.** Malm J, Birn H, Frohm B, Hansen SI, Høier-Mandsen M, Holm J. A minor fraction of a high-affinity folate binding protein from the epididymis is associated with membranous vesicles and spermatozoa in human semen. *Int J Androl* 2005;28:267-74.
- 173.** Wu M, Gunning W, Ratnam M. Expression of folate receptor type α in relation to cell type, malignancy, and differentiation in ovary, uterus, and cervix. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8:775-82.
- 174.** Matsue H, Rothberg, Takashima A, Kamen BA, Anderson RG, Lacey SW. Folate receptor allows cells to grow in low concentrations of 5-methyltetrahydrofolate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6006-9.
- 175.** Holm J, Hansen SI, Høier-Mandsen M, Helkjæ PE. A folate binding protein in ascitic fluid, serum and ovarian tissue of patients with ovarian adenocarcinoma immunoreacts with antibodies against human milk folate binding protein. *Biosci Rep.* 1998;18:49-57.
- 176.** Rijnbout S, Jansen G, Posthuma G, Hynes JB, Schornagel JH, Strous GJ. Endocytosis of GPI-linked membrane folate receptor- α . *J Cell Biol* 1996;132:35-47.
- 177.** Sabharanjak S, Mayor S. Folate receptor endocytosis and trafficking. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:1099-109.
- 178.** Ratnam M, Marquardt H, Duhring JL, Freisheim JH. Homologous membrane folate binding proteins in human placenta: cloning and sequence of a cDNA. *Biochemistry* 1989;28:8249-54.
- 179.** Shen F, Ross JF, Wang X, Ratnam M. Identification of a novel folate receptor, a truncated receptor, and receptor type β in hematopoietic cells: cDNA cloning, expression, immunoreactivity, and tissue specificity. *Biochemistry* 1994;33:1209-15.
- 180.** Ragoussis J, Senger G, Trowsdale J, Campbell IG. Genomic organization of the human folate receptor genes of chromosome 11q13. *Genomics* 1992;14:423-30.
- 181.** Elnakat H, Ratnam M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:1067-84.
- 182.** Elwood PC, Nachmanoff K, Saikawa Y, Page ST, Pacheco P, Roberts S, et al. The divergent 5' termini of the α human folate receptor (hFR) mRNAs originate from two tissue-specific promoters and alternative splicing: characterization of the α hFR gene structure. *Biochemistry* 1997;36:1467-78.
- 183.** Wang H, Ross JF, Ratnam M. Structure and regulation of a polymorphic gene encoding folate receptor type γ/γ' . *Nucleic Acids Res* 1998;26:2132-42.
- 184.** Shen F, Ross JF, Miller D, Ratnam M. Folate receptor type γ is primarily a secretory protein due to lack of an efficient signal for glycosylphosphatidylinositol modification: protein characterization and cell type specificity. *Biochemistry* 1995;34:5660-6.
- 185.** Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnam M. Differential regulation of folate receptors isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer* 1994;73:2432-43.
- 186.** Ross JF, Wang H, Behm FG, Mathew P, Wu M, Booth R, et al. Folate receptor type β is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia. *Cancer* 1999;85:348-57.
- 187.** Wang X, Shen F, Freisheim JH, Gentry LE, Ratnam M. Differential stereospecificities and affinities of folate receptor isoforms for folate compounds and antifolates. *Biochem Pharmacol* 1992;44:1898-901.
- 188.** Maziarz KM, Monaco HL, Shen F, Ratnam M. Complete mapping of divergent

amino acids responsible for differential ligand binding of folate receptors α and β . *J Biol Chem* 1999;274:11086-91.

189. Spiegelstein O, Eudy JD, Finnell RH. Identification of two putative novel folate receptor genes in human and mouse. *Gene* 2000;258:117-125.

190. Sadasivan E, Cedeno M, Rothenberg SP. Genomic organization of the gene and a related pseudogene for a human folate binding protein. *Biochem Biophys Acta* 1992;1131:91-4.

191. Shayegui M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 2005;122:789-801.

192. Zhao R, Min SH, Qiu A, Sakaris A, Goldberg GL, Sandoval C, et al. The spectrum of mutations in the PCFT gene, coding for an intestinal folate transporter, that are the basis for hereditary folate malabsorption. *Blood* 2007;110:1147-52.

193. Subramanian VS, Marchant JS, Said HM. Apical membrane targeting and trafficking of the human proton-coupled transporter in polarized epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C233-C40.

194. Qiu A, Min SH, Jansen M, Malhotra U, Tsai E, Cabelof DC, et al. Rodent intestinal folate transporters (SLC46A1): secondary structure, functional properties, and response to dietary restriction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:C1669-78.

195. Collins JF. Novel insights into intestinal and renal folate transport. Focus on "Apical membrane targeting and trafficking of the human proton-coupled folate transporter in polarized epithelia". *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C381-2.

196. Wang Y, Zhao R, Goldman ID. Characterization of a folate transporter in HeLa cells with a low pH optimum and high affinity for pemetrexed distinct from the reduced folate carrier. *Clin Cancer Res* 2004;10:6256-64.

197. Wang Y, Rajgopal A, Goldman ID, Zhao R. Preservation of folate transport activity with a low-pH optimum in rat IEC-6 intestinal cell lines that lack reduced folate carrier function. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:C65-71.

198. Jebnoun S, Kacem S, Mokrani C, Chanchoub A, Khrouf N, Zittoun J. A family study of congenital malabsorption of folate. *J Inherit Metab Dis* 2001;24:749-50.

199. Geller J, Kronn D, Jayabose S, Sandoval C. Hereditary folate malabsorption: family report and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2002;81:51-68.

200. Wolf G. Identification of proton-coupled high-affinity human intestinal folate transporter mutated in human hereditary familial folate malabsorption. *Nutr Rev* 2007;65:554-7.

201. Lasry I, Berman B, Straussberg R, Sofer Y, Bessler H, Sharkia M, et al. A novel loss of function mutation in the proton-coupled folate transporter from a patient with hereditary folate malabsorption reveals that Arg 113 is crucial for function. *Bloom* 2008;112:2055-61.

202. Inoue J, Nakai Y, Ueda S, Kamigaso S, Ohta K, Hatakeyama M, et al. Functional characterization of PCFT/HCP1 as the molecular entity of the carrier-mediated intestinal folate transport system in the rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G660-8.

203. Zhao R, Goldman ID. The molecular identity and characterization of a proton-coupled folate transporter-PCFT; biological ramifications and impact on the activity of pemetrexed. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:129-39.

204. Ramaekers VT, Rothenberg SP, Sequeira JM, Opladen T, Blau N, Quadros EV, et al. Autoantibodies to folate receptors in the cerebral folate deficiency syndrome. *N Engl J Med* 2005;352:1985-91.

205. Ramaekers VT, Sequeira JM, Blau N, Quadros EV. A milk-free diet downregulates folate receptor autoimmunity in cerebral folate deficiency syndrome. *Dev Med Child Neurol* 2008;50:346-52.

206. Anderson RGW, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* 1992;255:410-1.

207. Wollack JB, Makori B, Ahlawat S, Koneru R, Picinich SC, Smith A, et al. Characterization of folate uptake by choroid

plexus epithelial cells in a rat primary culture model. *J Neurochem* 2008;104:1494-1503.

208. Murphy RF, Power S, Cantor CR. Endosome pH measured in single cells by dual fluorescence flow cytometry: rapid acidification of insulin to pH. *Journal of Cell Biology*. 1984;98:1757-62.

209. Rothenberg SP, da Costa MP, Sequeira JM, Cracco J, Roberts JL, Weedon J, et al. Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *N Engl J Med* 2004;350:134-42.

210. da Costa M, Sequeira JM, Rothenberg SP, Weedon J. Antibodies to folate receptors impair embryogenesis and fetal development in the rat. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2003;67:837-847.

211. Blik JB, Rothenberg SP, Steegers-Theunissen RPM. Maternal folate receptor autoantibodies and cleft lip and/or palate. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;93:142-3.

212. Neuman A, Hernandez-Robles J, Rothenberg S, Hodge D, Roczek A, Mathias L, et al. Could maternal autoantibodies against folate receptor-membrane proteins cause spontaneous abortion or congenital heart defects? In: 27th Annual Meeting of the Society for Maternal-Fetal Medicine. San Francisco, California. *Am J Gynecol* 2007, S229.

213. Shahbazian MD, Zoghbi HY. Rett syndrome and MecP2: linking epigenetics and neuronal function. *Am J Hum Genet* 2002;71:1259-72.

214. Chahrour M, Zoghbi HY. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* 2007;56:422-37.

215. Ramaekers VT, Sequeira JM, Artuch R, Blau N, Temudo T, Ormazabal A, et al. Folate receptor autoantibodies and spinal fluid 5-methyltetrahydrofolate deficiency in Rett syndrome. *Neuropediatrics* 2007;38:179-183.

216. Tatusova TA, Madden TL. BLAST2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* 1999;174:247-50.

217. Ramaekers VT, Blau N. Cerebral folate deficiency. *Dev Med Child Neurol* 2004;46:843-51.

218. Ramaekers VT, Blau N, Sequeira JM, Nassogne MC, Quadros EV. Folate receptor autoimmunity and cerebral folate deficiency in low-functioning autism with neurological deficits. *Neuropediatrics* 2007;38:276-281.

219. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child* 1943;2:217-50.

220. Cabrera RM, Shaw GM, Ballard JL, Carmichael SL, Yang W, Lammer EJ, et al. Autoantibodies to folate receptor during pregnancy and neural tube defect risk. *J Reprod Immunol* 2008;79:85-92.

221. Taparia S, Gelineau-van Waes J, Rosenquist TH, Finnell RH. Importance of folate-homocysteine homeostasis during early embryonic development. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1717-27.

222. Knutson KL, Krco CJ, Erskine CL, Goodman K, Kelemen LE, Wettstein PJ, et al. T-cell immunity to the folate receptor alpha is prevalent in women with breast or ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:4254-61.

223. Murphy MM, Scott JM, McPartlin JM, Fernandez-Ballart JD. The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic acid supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in a longitudinal study. *Am J Clin Nutr* 2002;76:614-9.

224. Murphy MM, Scott JM, Arija V, Molloy AM, Fernandez-Ballart JD. Maternal homocysteine before conception and throughout pregnancy predicts fetal homocysteine and birth weight. *Clin Chem* 2004;50:1406-12.

225. Murphy MM, Malloy AM, Ueland PM, Fernández-Ballart JD, Schneede J, Arija V, et al. Longitudinal study of the effect of pregnancy on maternal and fetal cobalamin status in healthy women and their offspring. *J Nutr* 2007;137:1863-7.

226. Ethical committee of the World Medical Association. Draft code of ethics on human experimentation. *BMJ* 1964;2:177-80.

227. <http://www.net/e/policy/b3.htm> (accés el 2 de febrer, 2009)
228. Molloy AM, Scott JM. Microbiological assay for serum, plasma and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method. *Methods Enzymol* 1997;281:43-53.
229. Kelleher BP, Broin SDO. Microbiological assay for vitamin B₁₂ performed in 96-well microtitre plates. *J Clin Pathol* 1991;44:592-5.
230. Bertran N, Camps J, Fernández-Ballart J, Murphy MM, Arija V, Ferré N, et al. Evaluation of a high-sensitivity turbidimetric immunoassay for serum C-reactive protein: application to the study of longitudinal changes throughout normal pregnancy. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:308-13.
231. Meyer K, Fredriksen Å, Ueland PM. High-level multiplex genotyping of polymorphisms involved in folate or homocysteine metabolism by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin Chem* 2004;50:391-402.
232. Ghitis J. The folate binding in milk. *Am J Clin Nutr* 1967;20:1-4.
233. Salter DN, Ford JE, Scott KJ, Andrews P. Isolation of the folate-binding protein from cow's milk by the use of affinity chromatography. *FEBS Lett* 1972;20:302-6.
234. Svendsen IB. The complete amino acid sequence of the folate-binding protein from cow's milk. *Carlsberg Res Commun* 1984;49:123-31.
235. Svendsen IB. Amino acid sequence homology between human and bovine low molecular weight folate binding protein isolated from milk. *Carlsberg Res Commun* 1982;47:371-6.
236. Luhrs CA, Sadasivan E, da Costa M, Rothenberg SP. The isolation and properties of multiple forms of folate binding protein in cultured KB cells. *Arch Biochem Biophys* 1986;250:94-105.
237. da Costa M, Rothenberg SP. Purification and characterization of folate binding proteins from rat placenta. *Biochim Biophys Acta* 1996;1292:23-30.
238. Wigertz K, Hansen I, Høier-Madsen M, Holm J, Jägerstad M. Effect of milk processing on the concentration of folate binding protein (FBP), folate-binding capacity and retention of 5-methyltetrahydrofolate. *Int J Food Sci Nutr* 1996;47:315-22.
239. Gregory III JF. Denaturation of the folacin-binding protein in pasteurized milk products. *J Nutr* 1982;112:1329-38.
240. Wagner C. Biochemical role of folate in cellular metabolism. A: Bailey LB editor. *Folate in health and disease*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1995. p. 23-42.
241. Kang SS, Wong PW, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 1987;36:458-62.
242. Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 1995;345:149-51.
243. McCaddon A, Davies G, Hudson P, Tandy S, Cattell H. Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type. *Int J Geriatr Psychiatry* 1998;13:235-9.
244. Frankenburg RF. The role of one-carbon metabolism in schizophrenia and depression. *Harv Rev Psychiatry* 2007;15:146-60.
245. Cashman KD. Homocysteine and osteoporotic fracture risk: a potential role for B vitamins. *Nutr Rev* 2005;63:29-36.
246. Bonkowsky JL, Ramaekers VT, Quadros EV, Lloyd M. Progressive encephalopathy in a child with cerebral folate deficiency syndrome. *J Child Neurol* 2008;23:1460-3.
247. Koenig MK, Perez M, Rothenberg S, Butler IJ. Juvenile onset central nervous system folate deficiency and rheumatoid arthritis. *J Child Neurol* 2008;23:106-7.
248. Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 2006;136 (6 Suppl):1741S-9S.
249. Undas A, Perla J, Lacinski M, Trzeciak W, Kaźmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke* 2004;35:1299-304.
250. Beydoun MA, Gary TL, Caballero BH, Lawrence RS, Cheskin LJ, Wang Y. Ethnic differences in dairy and related nutrient consumption among US adults and their

- association with obesity, central obesity, and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1914-25.
- 251.** Konstantinova SV, Vollset SE, Berstad P, Ueland PM, Drevon CA, Refsum H, et al. Dietary predictors of plasma total homocysteine in the Hordaland Homocysteine Study. *Br J Nutr* 2007;98:201-10.
- 252.** Allen CA, Torres AG. Host-microbe communication within the GI tract. *Adv Exp Med Biol* 2008;635:93-101.
- 253.** Mason KL, Huffnagle GB, Noverr MC, Kao JY. Overview of gut immunology. *Adv Exp Med Biol* 2008;635:1-14.
- 254.** Chwatko G, Jakubowski H. The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma. *Anal Biochem* 2005;337:271-7.
- 255.** Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J* 1999;13:2277-83.
- 256.** Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1295S-303S.
- 257.** Tamura T, Picciano MF. Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr* 2006;83:993-1016.
- 258.** Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 1976;51:944-50.
- 259.** Kirke PN, Molloy AM, Daly SE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *QJM* 1993;86:703-8.
- 260.** Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340:1796-9.
- 261.** Blohm F, Fridén B, Milsom I. A prospective longitudinal population-based study of clinical miscarriage in an urban Swedish population. *BJOG* 2008; 115:176-82.
- 262.** Nguyen RHN, Wilcox AJ. Terms in reproductive and perinatal epidemiology: I. Reproductive terms. *J Epidemiol Community Health* 2005;59:916-9.
- 263.** O'Neill CO. Endogenous folic acid is essential for normal development of preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1998;13:1312-6.
- 264.** Steegers-Theunissen RPM, Smith SC, Steegers EAP, Guilbert LJ, Baker PN. Folate affects apoptosis in human trophoblastic cells. *Br J Obstet Gynaecol* 2000;107:1513-5.
- 265.** George L, Mills JL, Johansson ALV, Nordmark A, Olander B, Granath F et al. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. *JAMA* 2002;288:1867-73.
- 266.** Spanish Society of Gynaecology and Obstetrics (SEGO) and Spanish National Health System. Recomendaciones sobre la suplementación con ácido fólico para la prevención de defectos del tubo neural. *Inf Ter Sist Nac Salud* 2001;25:66-67.
- 267.** Smith HKA, Amick TS, Evers JLH, Collins JA. The spontaneous pregnancy prognosis in untreated subfertile. *Hum Reprod* 1997;12:1582-8.
- 268.** Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:28.
- 269.** Ebisch IMW, Thomas CMG, Peters WHM, Braat DDM, Steegers-Theunissen RPM. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update* 2007;13:163-74.
- 270.** Vanselow J, Pöhland R, Fürbas R. Promoter-2-derived Cyp19 expression in bovine granulosa cells coincides with gene-specific DNA hypo-methylation. *Mol Cel Endocrinol* 2005;233:57-64.
- 271.** Yu J, Yu L, Bugawan TL, Erlich HA, Barriga K, Hoffman M, et al. Transient antiislet autoantibodies: infrequent occurrence and lack of association with genetic risk factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2421-8.
- 272.** Cheng HM, Chamley L. Cryptic natural autoantibodies and co-potentiators. *Autoimmun Rev* 2008;7:431-4.
- 273.** Carrascosa A. Crecimiento intrauterino: factores reguladores. Retraso de crecimiento intrauterino. *An Pediatr* 2003;58(Supl 25):55-73.

- 274.** Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993;341:938-41.
- 275.** Godfrey KM, Barker DJP. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71(5 suppl):1344S-52S.
- 276.** Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007;261:412-7.
- 277.** Ballabriga A, Carrascosa A. Nutrición fetal: retraso del crecimiento intrauterino. A: Nutrición en la infancia y adolescencia. 2ª ed.. Madrid: Ediciones Ergon, S.A.; 2001. p.1-48
- 278.** Wilcox AL. On the importance – and the unimportance – of birthweight. *Int J Epidemiol* 2001;30:1233-41.
- 279.** Goldenberg RL, Tamura T, Cliver SP, Cutter GR, Hoffman HJ, Copper RL. Serum folate and fetal growth retardation: a matter of compliance? *Obstet Gynecol* 1992;79:719-22.
- 280.** Fernández-Ballart JD, Arijá V, Cucó G, Murphy M. Nutrición durante el embarazo y la lactancia. A: Serra LI, Aranceta J. Nutrición y Salud Pública. Métodos, bases científicas y aplicaciones. 2ª ed. Barcelona:Masson, 2006 p.275-87.
- 281.** Haggarty P, Allstaff S, Hoard G, Ashton J, Abramovich DR. Placental nutrient transfer capacity and fetal growth. *Placenta* 2002;23:86-92.
- 282.** Henderson GI, Perez T, Schenker S, Mackins J, Antony AC. Maternal-to-fetal transfer of 5-methyltetrahydrofolate by the perfused human placental cotyledon: evidence for a concentrative role by placental folate receptors in fetal folate delivery. *J Lab Clin Med* 1995;126:184-203.
- 283.** Giugliani ER, Jorge SM, Gonçalves AL. Serum vitamin B₁₂ levels in parturients, in the intervillous space of the placenta and in full-term newborns and their interrelationships with folate levels. *Am J Clin Nutr* 1985;41:330-5.
- 284.** Scoll TO, Hediger ML, Schall JI, Khoo CS, Fischer RL. Dietary and serum folate: their influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr* 1996;63:520-5.
- 285.** Jansen G, Kathman I, Rademaker BC, Braakhuis BJ, Westerhof GR. Expression of a folate binding protein in L1210 cells grown in low folate medium. *Cancer Res* 1989;49:1959-63.
- 286.** Hsueh CT, Dolnick BJ. Altered folate-binding protein mRNA stability in KB cells grown in folate-deficient medium. *Biochem Pharmacol* 1993;45:2537-45.
- 287.** Campbell IG, Jones TA, Foukles WD, Trowsdale J. Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer. *Cancer Res* 1991;51:5329-38.
- 288.** Coney LR, Tomassetti A, Carayannopoulos L, Frasca V, Jamen BA, Colnaghi MI, et al. Cloning of a tumor-associated antigen: MOv18 and MOv19 antibodies recognize a folate-binding protein. *Cancer Res* 1991;51:6125-32.
- 289.** Assaraf YG, Goldman ID. Loss of folic acid exporter function with markedly augmented folate accumulation in lipophilic antifolate-resistant mammalian cells. *J Biol Chem* 1997;272:17460-6.
- 290.** Brigle KE, Westin EH, Houghton MT, Goldman ID. Characterization of two cDNAs encoding folate-binding proteins from L1210 murine leukemia cells. Increased expression associated with a genomic rearrangement. *J Biol Chem* 1991;266:17243-9.
- 291.** Brigle KE, Westin EH, Houghton MT, Goldman ID. Insertion of an intracisternal A particle within the 5'-regulatory region of a gene encoding folate-binding protein in L1210 leukemia cells in response to low folate selection. Association with increased protein expression. *J Biol Chem* 1992;267:22351-5.
- 292.** Yasuda S, Hasui S, Yamamoto C, Yoshioka C, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T, Iseki K. Placental folate transport during pregnancy. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;72:2277-8
- 293.** Landon MJ, Oxley A. Relation between maternal and infant blood folate activities. *Arch Dis Child* 1971;46:810-4.
- 294.** Ek J. Plasma and red cell folate values in newborn infants and their mothers in

- relation to gestational age. *J Pediatr* 1980;97:288-92.
- 295.** Guerra-Shinohara EM, Paiva AA, Rondó PHC, Yamasaki K, Terzi CA, D'Almeida V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B₁₂. *BJOG* 2002;109:784-91.
- 296.** Molloy AM, Mills JL, McPartlin J, Kirke PN, Scott JM, Daly S. Maternal and fetal plasma homocysteine concentrations at birth: the influence of folate, vitamin B12, and the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T variant. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:499-503.
- 297.** Holmes VA, Wallace JM, Alexander HD, Gilmore WS, Bradbury I, Ward M, Scott JM, McFaul P, McNulty H. Homocysteine is lower in the third trimester of pregnancy in women with enhanced folate status from continued folic acid supplementation. *Clin Chem* 2005;51:629-34.
- 298.** Rondo PHC, Tomkins AM. Folate and intrauterine growth retardation. *Ann Trop Paediatr* 2000;20:253-8.
- 299.** Cruikshank DP, Wigton TR, Hays PM. Maternal physiology in pregnancy. A: Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL, eds. *Obstetrics: normal and problem pregnancies*. New York: Churchill Livingstone, 1996:91-109
- 300.** Brouwer J, Erik W, Reijngoud DJ, van Doormaal JJ, Muskiet FAJ. Plasma folic acid cutoff value, derived from its relationship with homocyst(e)ine. *Clin Chem* 1998;44:1545-50.
- 301.** Bentivoglio G, Melica F, Cristoforoni O. Folinic acid in the treatment of human male infertility. *Fertil Steril* 1993;60:698-701.
- 302.** Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RPM. Effects of folic acid and zinc sulphate on male factor subfertility: a double-blind randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 2002;77:491-8.
- 303.** Ebisch IM, Pierik FH, De Jong CM, Steegers-Theunissen RPM. Does folic acid and zinc sulphate intervention affect parameters and sperm characteristics in men? *Int J Androl* 2006;29:339-45.
- 304.** de Krester DM. Male infertility. *Lancet* 1997;349:787-90
- 305.** Kimura M, Umegaki K, Higuchi M, Thomas P, Fenech M. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. *J Nutr* 2004;134:48-56.
- 306.** Gibert MJ, Martín I, Ramos M. Uso de folatos para la prevención de los defectos del tubo neural en la población atendida en un hospital de referencia. *Med Clin (Barc)* 2003;121:677-8.
- 307.** Bekkers RLM, Eskes TKAB. Periconceptional folic acid intake in Nijmegen, Netherlands. *Lancet* 1999;353:292.
- 308.** de Weed S, Thomas CM, Cikot RJ, Steegers-Theunissen RP, de Boo TM, Steegers EA. Preconception counseling improves folate status of women planning pregnancy. *Obstet Gynecol* 2002;99:45-50.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES
Maria Isabel Berrocal Zaragoza
ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009



APORTACIONS CIENTÍFIQUES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

APORTACIONS CIENTÍFIQUES

Articles científics

Els resultats obtinguts en aquesta tesi, s'han publicat o estan en procés de preparació per enviar a una revista científica. L'**ANNEX 3**, inclou aquests articles. Les referències bibliogràfiques d'aquests són:

Berrocal-Zaragoza MI, Fernández-Ballart JD, Murphy MM, Cavallé-Busquets P, Sequeira JM, Quadros EV. Association between blocking folate receptor autoantibodies and subfertility. *Fertil Steril* 2008 Oct 22 (doi:10.1016/j.fertnstert.2008.08.104)

Berrocal-Zaragoza MI, Murphy MM, Ceruelo S, Quadros EV, Sequeira JM, Fernández-Ballart JD. High milk consumers have an increased risk of folate receptor blocking autoantibody production but this does not affect folate status in Spanish men and women. *J Nutr* 2009;139 Mar 12 (doi:10.3945/jn.108.102475)

Contribucions a Congressos

Tres participacions a congressos internacionals en forma de pòster:

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

Murphy MM, **Berrocal-Zaragoza MI**, Quadros EV, Sequeira JM, Ceruelo S, Fernández-Ballart JD. Prevalence of blocking folate receptor autoantibodies and interactions with

folate status in a population study. FASEB Summer Research Conference. Folic Acid, Vitamin B12 and One Carbon Metabolism. Lucca (Itàlia), 2008.

Berrocal-Zaragoza MI, Fernández-Ballart JD, Murphy MM, Cavallé-Busquets P, Salat-Batlle J, Albaiges-Baiget G, Sequeira JM, Quadros EV.

Association between blocking folate receptors autoantibodies and subfertility. FASEB Summer Research Conference. Folic Acid, Vitamin B12 and One Carbon Metabolism. Lucca (Itàlia), 2008.

Premis

Premi de la Fundació Caixa Sabadell pel projecte "Relació dels receptors de folat i complicacions de l'embaràs", amb 7500 euros.

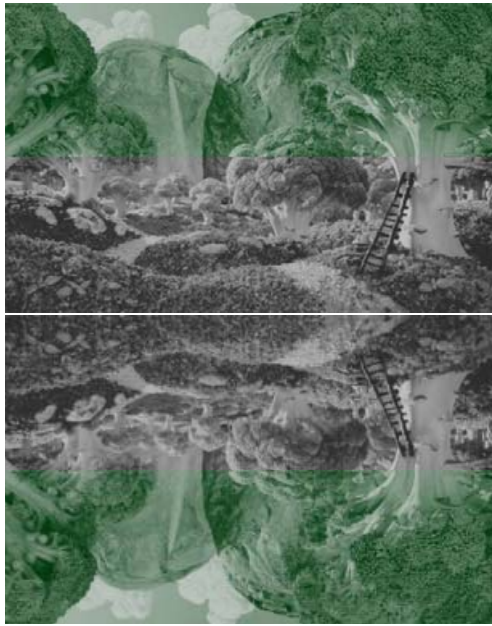
Student, post Doc Poster Award. Premiat per la Federation of American Societies For Experimental Biology (FASEB), amb 500 dòlars.

Altres d'interès

Participació activa en posada a punt del treball de camp de l'estudi NUTCIR al Hospital Universitari Sant Joan de Reus des del 2004.

Creació amb la col·laboració de Pere Cavallé-Busquets d'un tríptic informatiu sobre l'embaràs, per les participants de l'estudi NUTCIR (**ANNEX 4**).

Establiment de col·laboració amb l'empresa SEIBE, S.A. de Reus (Tarragona) amb l'estudi NUTCIR, amb un regal pels nounats de les participants d'aquest estudi.



ANNEXES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

ANNEX 1

PROTOCOLS PER LA PREPARACIÓ DE REACTIUS

Protocols per la preparació de les solucions necessàries per la realització de les tècniques descrites al *CAPÍTOL 1*. En cadascun dels protocols s'especifica els reactius necessaris, el procediment a seguir i certes consideracions a tenir en compte per la seva preparació. Els protocols que conté aquest annex són:

- Protocol 1. Tampó fosfat-1*
- Protocol 2. NaPO₄ dibàsic 0.1M*
- Protocol 3. NaPO₄ monobàsic 0.1M*
- Protocol 4. Tampó fosfat-1/NaCl*
- Protocol 5. Tampó fosfat-2*
- Protocol 6. NaPO₄ dibàsic 0.01M*
- Protocol 7. NaPO₄ monobàsic 0.01M*
- Protocol 8. Tampó àcid-1*
- Protocol 9. Glicina / HCl 1M, pH 2.5*
- Protocol 10. Triton X-100 al 10%*
- Protocol 11. NaPO₄ dibàsic 1M*
- Protocol 12. Urea 6M*
- Protocol 13. NaCl 4M*
- Protocol 14. Tampó base*
- Protocol 15. ASB-TC al 10%*
- Protocol 16. EDTA 0.5M*
- Protocol 17. Carboni activat/dextrà al 10%*
- Protocol 18. Carboni activat/dextrà al 5%*
- Protocol 19. Tampó àcid-2*
- Protocol 20. Tampó glicina / HCl, pH 2.5*
- Protocol 21. Botons de carboni activat/dextrà al 5%*
- Protocol 22. Tampó àcid-3*
- Protocol 23. Tampó glicina / HCl, pH 2.8*
- Protocol 24. Botons de carboni activat 5% / dextrà 1%*
- Protocol 25. Carboni activat 5% / Dextrà 1%*
- Protocol 26. Tampó fosfat-EDTA*
- Protocol 27. Tampó fosfat-3*
- Protocol 28. SNC-TC*
- Protocol 29. Tampó rentat*

Protocol 1. Tampó fosfat-1

FÓRMULA: NaPO_4 0.1M 1% *Triton X-100 Ultrade*, pH 7.4

REACTIUS:

- NaPO_4 dibàsic 0.1M (**Protocol 2**).
- NaPO_4 monobàsic 0.1M (**Protocol 3**).
- *Triton X-100 Ultrade (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ, USA)*.

CONSIDERACIONS:

- El *Triton X-100 Ultrade* és molt dens. Per dispensar-lo tallar al biaix l'extrem més estret de la punta de micropipeta. Tant a l'aspirar-lo com al dispensar-lo fer-ho lentament.

PROCEDIMENT:

- Dispensar 1 L de NaPO_4 dibàsic 0.1M en un vas de precipitats de 2 L i un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Calibrar el pH-metre i introduir l'elèctrode en la solució de NaPO_4 dibàsic 0.1M. Posar en funcionament l'agitador magnètic.
- Amb la solució NaPO_4 monobàsic 0.1M ajustar el pH fins a 7.4.
- Mesurar amb una proveta graduada el volum final de la solució preparada.
- Dispensar tota la solució preparada de nou al vas de precipitats, amb l'imat agitador i sobre l'agitador magnètic.
- Afegir 1 mL de *Triton X-100 Ultrade* per cada 99 mL de solució.
- Guardar el tampó fosfat-1 en ampolles de vidre amb tap de rosca a temperatura ambient.

Protocol 2. Na_2HPO_4 dibàsic 0.1M

FÓRMULA: Na_2HPO_4 dibàsic 0.1M
(Preparació de 1 L de NaPO_4 dibàsic 0.1M)

REACTIU:

- Na_2HPO_4 dibàsic 1M (*Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA*).

CONSIDERACIONS:

- Quan el NaPO_4 dibàsic 1M entra en contacte amb l'aigua destil·lada, es cristal·litza. Per evitar-ho incorporar-lo lentament i amb continuu moviment de l'aigua destil·lada.

PREPARACIÓ:

- Dispensar en un matràs aforat 800 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Amb l'agitador en funcionament, afegir 14.19 g de Na_2HPO_4 dibàsic 1M lentament. Deixar dissoldre completament.
- Retirar el imant agitador del matràs i enrasar amb aigua destil·lada fins a 1 L.
- Tapar el matràs, i barrejar bé la dissolució per inversió.

Protocol 3. NaPO₄ monobàsic 0.1M

FÓRMULA: NaH₂PO₄· H₂O monobàsic 0.1M
(Preparació de 500 mL de NaPO₄ monobàsic 0.1M)

REACTIU:

- NaH₂PO₄· H₂O monobàsic 1M (*Sigma-Aldrich, LTD. St., Louis, MO, USA*).

PREPARACIÓ:

- Dispensar en un matràs aforat de 500 mL, 400 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament afegir 6.89 g de NaH₂PO₄· H₂O monobàsic 1M. Deixar dissoldre completament.
- Retirar l'imant agitador del matràs aforat i enrasar amb aigua destil·lada fins a 500 mL.
- Tapar el matràs i barrejar bé la dissolució per inversió.

Protocol 4. Tampó fosfat-1/NaCl

FÓRMULA: NaPO₄ 0.1M, 1% Triton X-100 Ultrade, NaCl 1M, pH 7.4

REACTIUS:

- Na₂HPO₄ dibàsic 1M (*Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA*).
- NaH₂PO₄· H₂O monobàsic 1M (*Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA*).
- NaCl 1M (*Fisher Scientific Fairlawn, NJ, USA*).

PREPARACIÓ SOLUCIÓ 1:

- Dispensar en un matràs aforat 800 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Amb l'agitador en funcionament, afegir 58.44 g de NaCl 1M i 14.19 g de Na₂HPO₄ dibàsic 1M lentament. Deixar dissoldre completament.
- Retirar el imant agitador del matràs i enrasar amb aigua destil·lada fins a 1 L.
- Tapar el matràs, i barrejar bé la dissolució per inversió.

PREPARACIÓ SOLUCIÓ 2:

- Dispensar en un matràs aforat, 800 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament afegir 58.44 g de NaCl 1M i 13.79 g de NaH₂PO₄· H₂O monobàsic 1M. Deixar dissoldre completament.
- Retirar l'imant agitador del matràs aforat i enrasar amb aigua destil·lada fins a 1 L.
- Tapar el matràs i barrejar bé la dissolució per inversió.

PREPARACIÓ SOLUCIÓ FINAL:

- Dispensar la solució 1 en un vas de precipitats de 2 L i un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Calibrar el pH-metre i introduir l'elèctrode en la solució 1. Posar en funcionament l'agitador magnètic.
- Amb la solució 2 ajustar el pH fins a 7.4.
- Mesurar amb una proveta graduada el volum final de la solució preparada.

- Dispensar tota la solució preparada de nou al vas de precipitats, amb l'imant agitador i sobre l'agitador magnètic.
- Afegir 1 mL de *Triton X-100 Ultrade* per cada 99mL de solució final preparada.

Protocol 5. Tampó fosfat-2

FÓRMULA: NaPO_4 0.01M, 1% *Triton X-100 Ultrade*, pH 7.4

REACTIUS:

- NaPO_4 dibàsic 0.01M (**Protocol 6**).
- NaPO_4 monobàsic 0.01M (**Protocol 7**).
- *Triton X-100 Ultrade* (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ, USA).

CONSIDERACIONS:

- El *Triton X-100 Ultrade* és molt dens. Per dispensar-lo tallar al biaix l'extrem de la punta de micropipeta. Tant al aspirar-lo com al dispensar-lo fer-ho lentament.

PROCEDIMENT:

- Dispensar 1 L de NaPO_4 dibàsic 0.01M a un vas de precipitats de 2 L i un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Calibrar el pH-metre i introduir l'elèctrode en la solució de NaPO_4 dibàsic 0.01M. Posar en funcionament l'agitador magnètic.
- Amb la solució NaPO_4 monobàsic 0.01M ajustar el pH fins a 7.4.
- Mesurar amb una proveta graduada el volum final de la solució preparada.
- Dispensar tota la solució preparada de nou al vas de precipitats, amb l'imant agitador i sobre l'agitador magnètic.
- Afegir 1 mL de *Triton X-100 Ultrade* per cada 99 mL de solució.
- Guardar el tampó fosfat-2 en ampolles de vidre amb tap de rosca a temperatura ambient.

Protocol 6. NaPO_4 dibàsic 0.01M

FÓRMULA: Na_2HPO_4 dibàsic 0.01M

(Preparació de 1 L de NaPO_4 dibàsic 0.01M)

REACTIU:

- Na_2HPO_4 dibàsic 1M (*Sigma-Aldrich, LTD. St. Louis, MO, USA*).

CONSIDERACIONS:

- Quan el NaPO_4 dibàsic 1M entra en contacte amb l'aigua destil·lada, es cristal·litza. Per evitar-ho incorporar-lo lentament amb continuu moviment de l'aigua destil·lada.

PREPARACIÓ:

- Dispensar en un matràs aforat 800 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.

- Amb l'agitador en funcionament, afegir 1.42 g de Na_2HPO_4 dibasic 1M. Deixar dissoldre completament.
- Incloure el Na_2HPO_4 dibasic 1M al matràs lentament.
- Retirar el imant agitador del matràs i enrasar amb aigua destil·lada fins a 1 L.
- Tapar el matràs, i barrejar bé la dissolució per inversió.

Protocol 7. NaPO_4 monobàsic 0.01M

FÓRMULA: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ monobàsic 0.01M
(Preparació de 500 mL de NaPO_4 monobàsic 0.01M)

REACTIU:

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ monobàsic 1M (*Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA*).

PROCEDIMENT:

- Dispensar en un matràs aforat de 500 mL, 400 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament afegir 0.69 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ monobàsic 1M.
- Incloure el $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ monobàsic 1M al matràs. Deixar dissoldre completament.
- Treure l'imant agitador del matràs aforat i enrasar amb aigua destil·lada fins a 500 mL.
- Tapar el matràs i barrejar bé la dissolució per inversió.

Protocol 8. Tampó àcid-1

FÓRMULA: Glicina / HCl 1M, 0.1% Triton X-100, pH 2.5
(Preparació de 101 mL de Tampó àcid-1)

REACTIUS:

- Glicina / HCl 1M, pH 2.5 (**Protocol 9**).
- Triton X-100 al 10% (**Protocol 10**).

PROCEDIMENT:

- En un vas de precipitats, dispensar 100 mL de Glicina / HCl 1M, pH 2.5 i un imant agitador. Col·locar sobre un agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament, afegir 1 mL de Triton X-100 al 10%.
- Retirar l'imant agitador.

Protocol 9. Glicina / HCl 1M, pH 2.5

FÓRMULA: Glicina 1M/ HCl, pH 2.5
(Preparació de 1 L de Glicina / HCl 1M, pH 2.5.)

REACTIUS:

- Glicina 1M (*Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA*).
- HCl 12N (*J. T. Barker, Phillipsburg, NJ, USA*).

PREPARACIÓ:

- Dispensar a un matràs aforat de 1 L, 800 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar sobre un agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament, afegir 75.07 g de glicina 1M. Deixar que es dissolgui completament.
- Retirar l'imant agitador i enrasar fins a 1 L amb aigua destil·lada.
- Transferir tota la dissolució preparada a un vas de precipitats de grans dimensions junt amb un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Calibrar el pH-metre i introduir l'elèctrode en la dissolució.
- Posar en funcionament l'agitador magnètic.
- Amb l'ajuda del HCl 12N ajustar el pH fins a 2.5.

Protocol 10. Triton X-100 al 10%

FÓRMULA: ***Triton X-100 Ultra*** al 10%

(Preparació de 100 mL de Triton X-100 al 10%)

REACTIU:

- *Triton X-100 Ultra* (*Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ, USA*).

CONSIDERACIONS:

- El *Triton X-100 Ultra* és molt dens. Per dispensar-lo tallar al biaix l'extrem de la punta de micropipeta. Tant al aspirar-lo com al dispensar-lo fer-ho lentament.

PREPARACIÓ:

- En un vas de precipitats de 200 mL, dispensar 100 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar sobre un agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament, 10 mL de *Triton X-100 Ultra* lentament.
- Retirar l'imant agitador i transferir tota la solució a una ampolla de vidre amb tap a rosca.
- Guardar a temperatura ambient.

Protocol 11. NaPO₄ dibàsic 1M

FÓRMULA: **Na₂HPO₄ dibàsic 1M**

(Preparació de 250 mL de NaPO₄ dibàsic 1M)

REACTIU:

- Na₂HPO₄ dibàsic 1M (*Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA*)

CONSIDERACIONS:

- A temperatura ambient, una dissolució aquosa de NaPO_4 dibàsic 1M es cristal·litza. Per dissoldre els cristalls, escalfar uns 10 segons al microones, tenint la precaució d'afluixar una mica el tap a rosca de l'ampolla que la conté. Una vegada escalfat, barrejar vigorosament amb moviments circulars. Pot repetir-se el procés fins la seva total dissolució. Es pot mantenir l'ampolla amb la dissolució aquosa de NaPO_4 dibàsic 1M sobre una placa calefactora (a temperatura mínima) mentre s'utilitza, per tal d'evitar la seva cristal·lització.

PROCEDIMENT:

- Dispensar a un matràs aforat de 250 mL, 200 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar sobre un agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament, afegir poc a poc 35.49 g de NaPO_4 dibàsic 1M. Deixar que es dissolgui completament.
- Retirar l'imant agitador i enrasar amb aigua destil·lada fins a 250 mL.
- Guardar en una ampolla de vidre amb tap a rosca a temperatura ambient.

Protocol 12. Urea 6M

FÓRMULA: **Urea 6M**

(Preparació de 100mL d'urea 6M)

REACTIU:

- Urea 1M (*Fisher Scientific Fairlawn, NJ, USA*).

PREPARACIÓ:

- En un vas de precipitats de 200 mL, dispensar 100 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar a sobre d'un agitador magnètic.
- Afegir 36 g d'urea 1M. Deixar que es dissolgui completament.
- Treure el imant agitador.
- Guardar en una ampolla de vidre amb tap a rosca i a temperatura ambient.

Protocol 13. NaCl 4M

FÓRMULA: **NaCl 4M**

(Preparació de 250 mL de NaCl 4M)

REACTIU:

- NaCl 1M (*Fisher Scientific Fairlawn, NJ, USA*).

PREPARACIÓ:

- Dispensar en un matràs aforat de 250 mL, uns 200 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar a sobre d'un agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament, afegir 58.44 g de NaCl 1M. Deixar que es dissolgui completament.
- Treure el imant agitador.

- Enrasar fins a 250 mL amb aigua destil·lada.
- Guardar en ampolla de vidre amb tap a rosca i a temperatura ambient.

Protocol 14. Tampó base

FÓRMULA: NaPO_4 1% *Triton X-100 Ultrade*, 0.05% ASB-TC, 10mM EDTA, pH 7.4

REACTIUS:

- Tampó fosfat-1 (**Protocol 1**).
- ASB-TC al 10% (**Protocol 15**).
- EDTA 0.5M (**Protocol 16**).

PREPARACIÓ:

- Dispensar en un vas de precipitats 100 mL de tampó fosfat-1 i un imant agitador. Col·locar a sobre d'un agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament, afegir 5 mL de ASB-TC al 10%.
- Afegir 200 μL d'EDTA 0.5M. Barrejar bé.
- Guardar en una ampolla de vidre amb tap a rosca a temperatura ambient.

Protocol 15. ASB-TC al 10%

FÓRMULA: **Albúmina sèrica bovina (ASB) tractada amb carboni activat (TC) al 10%**
(Preparació de 100 mL de ASB-TC al 10%)

REACTIUS:

- Albúmina sèrica bovina (*Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA*).
- Carboni activat (*Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA*).

PREPARACIÓ:

- Dispensar a un vas de precipitats de 200 mL, 90 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Amb l'agitador en funcionament, afegir 100 g d'albúmina sèrica bovina, i deixar que es dissolgui completament.
- Transferir a una proveta graduada i enrasar fins a 100 mL.
- Transferir la dissolució de nou a un vas de precipitats, amb un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament, afegir 2 g de carboni activat. Deixar que es dissolgui completament (aproximadament 5 minuts).
- Repartir la mescla en 4 tubs de policarbonat de 50 mL. Assegurar-se que els 4 tubs contenen el mateix volum per evitar desequilibris a la ultracentrífuga.
- Centrifugar a $23425 \times g$ a 4°C durant 5 minuts.
- Sense retirar els tubs del rotor de la ultracentrífuga, girar els tubs 180 graus amb cura de no moure el botó de carboni activat. I tornar a centrifugar a les mateixes condicions.
- Recuperar el sobrenedant en una ampolla amb l'ajuda d'un embut i paper de filtre.
- Repartir el sobrenedant recuperat en diversos tubs tipus *Falcon* i guardar a -20°C , per evitar la seva contaminació.

Protocol 16. EDTA 0.5M

FÓRMULA: **0.5M EDTA dipotassium salt, dihydrate Ultrapure**
(Preparació de 100 mL de EDTA 0.5M)

REACTIUS:

- 0.5M EDTA *dipotassium salt, dihydrate Ultrapure (Amresco, Solon, OH, USA)*.

PREPARACIÓ:

- Dispensar a un vas de precipitats de 200 mL, 100 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament, afegir 20.2 g de 0.5M EDTA *dipotassium salt, dihydrate Ultrapure*. Deixar que es dissolgui completament.
- Guardar en ampolla de vidre amb tapa a rosca i a temperatura ambient.

Protocol 17. Carboni activat / dextrà al 10%

FÓRMULA: **Carboni activat al 10% recobert amb dextrà al 10%**
(Preparació de 50 mL de carboni activat al 10% recobert amb dextrà al 10%)

REACTIU:

- Carboni activat / dextrà al 5% (**Protocol 18**).

CONSIDERACIONS:

- Tota solució que conté carboni activat / dextrà té tendència a precipitar. Abans de transferir un volum d'una solució amb aquestes característiques, procurar que la solució sigui homogènia (resuspendre el precipitat).

PREPARACIÓ:

- Preparar 100 mL de Carboni activat/dextrà al 5%.
- Transferir 50 mL de carboni activat / dextrà al 5% a dos tubs tipus *Falcon*.
- Centrifugar a 1163 x g durant 5 minuts.
- Subjectar el tub tipus *Falcon* a l'altura dels ulls, i aspirar el sobrenedant amb un sistema d'aspiració per buit fins que al tub quedi un volum de 25 mL. Repetir el procés amb l'altre tub tipus *Falcon*.
- Resuspendre el precipitat de carboni activat.
- Transferir el contingut dels dos tubs tipus *Falcon* a una ampolla amb tap de rosca, i guardar a 4°C fins el moment de la seva utilització.

Protocol 18. Carboni activat / dextrà al 5%

FÓRMULA: **Carboni activat al 5% recobert amb dextrà al 5%**
(Preparació de 100 mL de carboni activat / dextrà al 5%)

REACTIUS:

- Carboni activat (*Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA*).
- Dextrà (*Polysciences Inc., Warrington, PA, USA*).
- Tampó fosfat-1 (**Protocol 1**).

PREPARACIÓ:

- Dispensar a un vas de precipitats de 200 mL, 100 mL de tampó fosfat-1 i un imant agitador. Col·locar sobre un agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament, afegir 5 g de dextrà. Deixar que es dissolgui completament.
- Afegir 5 g de carboni activat. Deixar que es dissolgui completament (aproximadament 10 minuts).
- Guardar la mescla en una ampolla de vidre amb tap a rosca a 4°C fins el moment de preparar els botons de carboni activat / dextrà al 5%.

Protocol 19. Tampó àcid-2

FÓRMULA: **Glicina/HCl 0.1M pH 2.5, 10mM EDTA, 0.1% ASB-TC**
(Preparació de 5mL aproximadament de tampó àcid-2)

REACTIUS:

- Tampó glicina / HCl, pH 2.5 (**Protocol 20**).
- ASB-TC al 10% (**Protocol 15**).
- EDTA 0.5M (**Protocol 16**).

CONSIDERACIONS:

- Preparar en condicions de fred. En un recipient amb gel en escames, incloure el tub tipus *Falcon* de 14 mL on es prepararà el tampó àcid-1, i mantenir-lo en aquestes condicions durant tot el procés tant en la seva preparació com en el procés de tractament àcid de les mostres en el que s'utilitza.

PROCEDIMENT:

- Dispensar 5 mL de Tampó glicina / HCl, pH 2.5.
- Afegir 50 µL de ASB-TC al 10%.
- Afegir 100 µL d'EDTA 0.5M.
- Barrejar bé la mescla amb l'ajuda d'un agitador de tubs.

Protocol 20. Tampó glicina / HCl, pH 2.5

FÓRMULA: **Glicina / HCl 0.1M, 1% Triton X-100 Ultrade, pH 2.5**
(Preparació de 1 L de tampó glicina / HCl 0.1M, pH 2.5)

REACTIUS:

- Glicina 1M (*Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA*).
- HCl 12N (*J. T. Baker Phillipsburg, NJ, USA*).
- *Triton X-100 Ultrade (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ, USA)*.

CONSIDERACIONS:

- El *Triton X-100 Ultrade* és molt dens. Dispensar-lo tallant al biaix l'extrem de la punta de micropipeta. Dispensar lentament.

PREPARACIÓ:

- Dispensar a un matràs aforat de 1 L, 800 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar sobre un agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament, afegir 7.5 g de glicina 1M. Deixar que es dissolgui completament. Retirar l'imant agitador i enrasar fins a 1 L amb aigua destil·lada.
- Transferir tota la dissolució preparada a un vas de precipitats de grans dimensions junt amb un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament i l'ajuda del pH-metre, ajustar el pH a 2.5, amb HCl 12N.
- Mesurar amb una proveta graduada, el volum total de la dissolució. Transferir la dissolució a un altre vas de precipitats de grans dimensions, amb l'imant magnètic i sobre l'agitador magnètic. Amb l'agitador magnètic en funcionament, afegir 1 mL de *Triton X-100 Ultrade* per cada 99 mL de tampó.
- Guardar en una ampolla de vidre amb tap a rosca a 4°C.

Protocol 21. Botons de carboni activat / dextrà al 5%

REACTIU:

- Carboni activat / dextrà al 5% (**Protocol 18**).

CONSIDERACIONS :

- Temperar la solució carboni activat / dextrà al 5% a temperatura ambient abans de començar a preparar els botons.
- Preparar sempre el número de botons necessaris per l'assaig.
- El carboni activat / dextrà al 5% té tendència a precipitar. Abans de transferir o pipetejar un volum, procurar que la solució sigui homogènia (resuspendre el precipitat).
- La solució de carboni activat / dextrà al 5% és molt densa. Per pipetejar el volum desitjat exacte, es tallarà al biaix l'extrem de la punta de micropipeta. Pipetejar sempre aquesta solució lentament.

PROCEDIMENT:

- Dispensar 250 µL de carboni activat / dextrà al 5% a cadascun dels tubs tipus *Eppendorf* de 1.5 mL a preparar (1 tub tipus *Eppendorf* per mostra a assajar).
- Per facilitar després l'aspiració del sobrenedant, col·locar els tubs a la centrífuga amb l'obertura del tap el més allunyat possible del centre del rotor. I centrifugar a 11269 x g, 3 minuts.
- Girar els tubs 180 graus (obertura del tap del tub quedarà el més a prop possible del centre del rotor). I tornar a centrifugar amb les mateixes condicions.
- Aspirar el sobrenedant amb un sistema d'aspiració per buit pel costat del tub on el botó està a un nivell inferior. Procurar no aspirar contingut del botó, i tampoc deixar sobrenedant.

Protocol 22. Tampó àcid-3

FÓRMULA: **Glicina / HCl 0.1M pH 2.8, 10 M EDTA, 1% Triton X-100 Ultrapure**
(Preparació de 5 mL aproximadament de tampó àcid-3)

REACTIUS:

- Tampó Glicina / HCl, pH 2.8 (**Protocol 23**).
- EDTA 0.5M

CONSIDERACIONS:

- Preparar en condicions de fred. En un recipient amb gel en escames, incloure el tub tipus *Falcon* de 14 mL on es prepararà el tampó àcid-2 i es mantindrà en aquestes condicions durant tot el procés, tant en la seva preparació com en el procés de tractament àcid de les mostres en el que s'utilitza.

PROCEDIMENT:

- Dispensar 5 mL de Tampó glicina / HCl, pH 2.8 a un tub tipus *Falcon*.
- Afegir 100 µL d'EDTA 0.5M.
- Barrejar bé la mescla amb l'ajuda d'un agitador de tubs.

Protocol 23. Tampó glicina / HCl, pH 2.8

FÓRMULA: **Glicina / HCl 0.1M, pH 2.8, 1% Triton X-100 Ultrapure**
(Preparació de 1 L de tampó glicina / HCl 0.1M, pH 2.8)

REACTIUS:

- Glicina 1M (*Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA*)
- HCl 12N (*J. T. Barker, Phillipsburg, NJ, USA*)
- *Triton X-100 Ultrapure (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ, USA)*

CONSIDERACIONS:

- El *Triton X-100 Ultrapure* és molt dens. Per dispensar-lo tallar al biaix l'extrem de la punta de micropipeta. Tant a l'aspirar-lo com al dispensar-lo fer-ho lentament.

PREPARACIÓ:

- Dispensar a un matràs aforat de 1 L, 800 mL d'aigua destil·lada i un imant agitador. Col·locar sobre un agitador magnètic. Amb l'agitador magnètic en funcionament, afegir 7.5 g de glicina 1M. Deixar que es dissolgui completament.
- Retirar l'imatge agitador i enrasar fins a 1L amb aigua destil·lada.
- Transferir tota la dissolució preparada a un vas de precipitats de grans dimensions junt amb un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Amb l'ajuda del HCl 12N ajustar el pH fins a 2.8. amb l'ajuda del pH-metre i amb l'agitador magnètic en funcionament.
- Mesurar amb una proveta graduada, el volum total de la dissolució.
- Transferir la dissolució a un altre vas de precipitats de grans dimensions, amb l'imatge magnètic i sobre l'agitador magnètic en funcionament afegir 1mL de *Triton X-100 Ultrapure* per cada 99 mL de tampó.
- Guardar en una ampolla de vidre i a 4°C.

Protocol 24. Botons de carboni activat 5% / dextrà 1%

REACTIU:

- Carboni activat 5% / dextrà 1% (**Protocol 25**).

CONSIDERACIONS :

- Temperar la solució carboni activat 5% / dextrà 1% a temperatura ambient abans de començar a preparar els botons.
- Preparar sempre el número de botons necessaris per l'assaig.
- El carboni activat 5% / dextrà 1% té tendència a precipitar. Abans de transferir o pipetejar un volum, procurar que la solució sigui homogènia (resuspendre el precipitat).
- La solució de carboni activat 5% / dextrà 1% és molt densa. Per pipetejar el volum desitjat exacte, es tallarà al biaix l'extrem de la punta de micropipeta. Pipetejar sempre aquesta solució lentament.

PROCEDIMENT:

- Dispensar 200 µL de carboni activat 5% / dextrà 1% a cadascun dels tubs tipus *Eppendorf* de 1.5 mL a preparar.
- Per facilitar després la recuperació del sobrenedant, col·locar els tubs a la centrífuga amb l'obertura del tap el més allunyat possible del centre del rotor. I centrifugar a 11269 x g, 5 minuts.
- Girar els tubs 180 graus (obertura del tap del tub quedarà el més a prop possible del centre del rotor). I tornar a centrifugar amb les mateixes condicions.
- Aspirar el sobrenedant amb un sistema d'aspiració per buit pel costat del tub on el botó està a un nivell inferior. Procurar no aspirar contingut del botó, i tampoc deixar sobrenedant.

Protocol 25. Carboni activat 5% / Dextrà 1%

FÓRMULA: Carboni activat al 5% recobert amb dextrà al 1%

(Preparació de 100 mL de carboni activat 5% / Dextrà 1%)

REACTIUS:

- Carboni activat (*Sigma-Aldrich, LTD., St. Louis, MO, USA*).
- Dextran (*Polisciences Inc., Warrington, PA, USA*).
- Tampó fosfat-1 (**Protocol 1**).

PREPARACIÓ:

- Dispensar en un vas de precipitats de 200 mL, 100 mL de tampó fosfat i un imant agitador. Col·locar sobre un agitador magnètic.
- Amb l'agitador magnètic en funcionament, afegir 1 g de dextrà. Deixar que es dissolgui completament.
- Afegir 5 g de carboni activat. Deixar que es dissolgui completament (aproximadament 10 minuts).
- Guardar la barreja en una ampolla amb tap a rosca a 4°C fins el moment del seu ús.

Protocol 26. Tampó fosfat-EDTA

FÓRMULA: NaPO_4 0.1M, 1% *Triton X-100 Ultrade*, 10 M EDTA, pH 7.4
(Preparar 100 mL de Tampó fosfat-EDTA)

REACTIUS:

- Tampó fosfat-1 (**Protocol 1**).
- EDTA 0.5M (**Protocol 16**).

PROCEDIMENT:

- Dispensar en un vas de precipitats de 200 mL, 98 mL de tampó fosfat-1 i un imant agitador. Col·locar sobre un agitador magnètic.
- Amb l'agitador en funcionament, dispensar 2 mL d'EDTA 0.5M. Mesclar bé.
- Guardar la mescla en una ampolla de vidre amb tap a rosca a temperatura ambient.

Protocol 27. Tampó fosfat-3

FÓRMULA: NaPO_4 0.1M, pH 7.4

REACTIUS:

- NaPO_4 dibàsic 0.1M (**Protocol 2**).
- NaPO_4 monobàsic 0.1M (**Protocol 3**).

PROCEDIMENT:

- Dispensar 1 L de NaPO_4 dibàsic 0.1M a un vas de precipitats de 2 L i un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic.
- Calibrar el pH-metre i introduir l'elèctrode en la solució de NaPO_4 dibàsic 0.1M. Posar en funcionament l'agitador magnètic.
- Amb la solució NaPO_4 monobàsic 0.1M ajustar el pH fins a 7.4.
- Guardar el tampó fosfat-1 en ampolles de vidre amb tap de rosca a temperatura ambient.

Protocol 28. SNC-TC

FÓRMULA: Sèrum normal de conill (SNC), tractat amb carboni activat (TC)
(Preparació de 100 mL de SNC-TC)

REACTIUS:

- Sèrum normal de conill.
- Carboni activat (*Sigma-Aldrich, LTC., St. Louis, MO, USA*).

CONSIDERACIONS:

- El SNC-TC, una vegada descongelat, pot tornar-se a congelar fins la propera vegada que es necessiti.

PREPARACIÓ:

- Dispensar en un vas de precipitats de 200 mL, 100 mL de sèrum normal de conill i un imant agitador. Col·locar sobre un agitador magnètic.
- Amb l'agitador en funcionament, afegir 2 g de carboni activat. Deixar homogeneïtzar completament (10 minuts aproximadament).
- Repartir la barreja en tubs de policarbonat de 50 mL.
- Precipitar el carboni activat, centrifugant a $26891 \times g$ a 4°C durant 10 minuts.
- Recuperar el sobrenedant filtrant-lo amb l'ajuda de gases.
- Tornar a centrifugar el filtrat sota les mateixes condicions i finalment filtrar el sobrenedant amb paper de filtre.
- Guardar en al·lòtques en tubs tipus *Falcon* a -20°C fins la seva utilització.

Protocol 29. Tampó rentat

FÓRMULA: **NaPO₄ 0.1M, Tween 20 0.05%, pH 7.4**
(Preparació de 200 mL de Tampó rentat)

REACTIUS:

- Tampó fosfat-2 (**Protocol 27**).
- Tween 20 (*Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA*).

CONSIDERACIONS:

- Preparar aquest tampó abans d'iniciar l'assaig. No es guardarà.
- A la **TAULA 17**, es descriu el volum mínim necessari de Tampó rentat en 1,4 i 8 rentats en 1 pou i en tota la microplaca. Aquests són volums mínims necessaris, però s'haurà de preparar una mica més. Per facilitar els càlculs, en aquest protocol es proporcionen els volums necessaris per la preparació d'un volum total requerit per assajar una microplaca (total de 8 rentats).

PREPARACIÓ:

- Dispensar en un vas de precipitats 199.9 mL de Tampó fosfat-2 i un imant agitador. Col·locar sobre l'agitador magnètic. Amb l'agitador en moviment, afegir 100 μL de Tween 20.

TAULA 15. Relació de volums mínims necessaris de tampó rentat utilitzat en la tècnica del *binding*.

		Volum tampó rentat	
		1 pou	1 microplaca
Rentats	1	250 μL	24 mL
	4	1 mL	96 mL
	8	2 mL	192 mL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

ANNEX 2

ENQUESTES D'HÀBITS I ESTIL DE VIDA DE L'ESTUDI NUTCIR

ENQUESTA 1 SOBRE HÀBITS I ESTIL DE VIDA

ANOTI LES RESPOSTES EN LES ESPAIS CORRESPONENTS A CADA PREGUNTA.
 Aquestes dades serviran a la Universitat Rovira i Virgili per fer un estudi comparatiu entre diferents poblacions. En els resultats mai apareixerà el seu nom.

ÚS DE SUPLEMENTS DE VITAMINES / MINERALS

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

- Ha pres per iniciativa pròpia o receptat per un metge algun tipus de suplement vitamínic / mineral?
 Mai n'he pres Si n'he pres

En el cas que sí, indiqui el nom del preparat i les vegades que ho ha pres habitualment amb una X. Posi una X en cada mes de l'embaràs que ho ha pres.

Exemple, una dona que ha pres cada dia àcid fòlic durant els primers 3 mesos, poposaria...

Nom del preparat	¿Cuántas veces a la semana?	Meses del embarazo				
		1	2	3	4	5
ÀCID FÒLIC	<input checked="" type="checkbox"/> Cada día <input type="checkbox"/> La mayoría de los días (4-6 veces) <input type="checkbox"/> Algunos días (1-3 veces)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Quin? : FOLIDOCE		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

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

ESMORZAR (durant l'embaràs)

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

TABAC

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

Només per fumadores en els últims 5 anys

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

	0 a 3 mesos	3 a 6 mesos	Més de 6 mesos
Deixat durant l'embaràs durant els mesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ALCOHOL

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

	0 a 3 mesos	3 a 6 mesos	Més de 6 mesos
Deixat durant l'embaràs durant els mesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- Ha pres algun altre tipus de substància tòxica (p.ex. marihuana, cocaïna, heroïna, etc...) en els últims 5 anys?
 Sí No

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

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

	0 a 3 mesos	3 a 6 mesos	Més de 6 mesos
Deixat durant l'embaràs durant els mesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ACTIVITAT FÍSICA (durant l'embaràs)

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

- Quina activitat feu en el temps de lleure?

Si varia amb l'estació, escollir el grup més representatiu (només 1 grup).

- Lectura, televisió i activitats que no requereixin activitat física important.....
- Caminar, anar amb bicicleta, jardineria (no s'inclou el transport d'anar i tornar del treball).....
- Córrer, esquiar, gimnàstica, jocs de pilota o esports vigorosos regularment.....
- Entrenament esportiu regular per competició

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

- Durant els últims 12 mesos

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

- Ha buscat / planificat aquest embaràs? Sí No

- Durant els 6 mesos abans de l'embaràs

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

- Anoti qualsevol dubte relacionat amb aquesta enquesta:

ENQUESTA 2 SOBRE HÀBITS I ESTIL DE VIDA

ANOTI LES RESPOSTES EN LES ESPAIS CORRESPONENTS A CADA PREGUNTA.
 Aquestes dades serviran a la Universitat Rovira i Virgili per fer un estudi comparatiu entre diferents poblacions. En els resultats mai apareixerà el seu nom.

ÚS DE SUPLEMENTS DE VITAMINES / MINERALS

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

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

Mai n'he pres Si n'he pres

En el cas que sí, indiqui el nom del preparat i les vegades que ho ha pres habitualment amb una X. Posi una X en cada mes de l'embaràs que ho ha pres.

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

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

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

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

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

ESMORZAR (durant l'embaràs)

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

TABAC

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

Només per fumadores en els últims 5 anys

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

	0 a 3 mesos	3 a 6 mesos	Més de 6 mesos
Deixat durant l'embaràs durant els mesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ALCOHOL

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

	0 a 3 mesos	3 a 6 mesos	Més de 6 mesos
Deixat durant l'embaràs durant els mesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- Ha pres algun altre tipus de substància tòxica (p.ex. marihuana, cocaïna, heroïna, etc...) en els últims 5 anys?
 Sí No

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

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

	0 a 3 mesos	3 a 6 mesos	Més de 6 mesos
Deixat durant l'embaràs durant els mesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ACTIVITAT FÍSICA (durant l'embaràs)

- Quina activitat física fa en el treball, estudi o feina de casa?
 - El meu treball és bàsicament d'estar asseguda i caminar poc (estudiant, docent, conductora de vehicles, dependent, administrativa)
 - Al meu treball camino força però no faig cap esforç vigorós (mestressa de casa, fàbrica, pagesa, venedora, carter...)
 - El meu treball és bàsicament de molta activitat física (esportista.)
- Quina activitat feu en el temps de lleure?
Si varia amb l'estació, escollir el grup més representatiu (només 1 grup).
 - Lectura, televisió i activitats que no requereixin activitat física important.....
 - Caminar, anar amb bicicleta, jardineria (no s'inclou el transport d'anar i tornar del treball).....
 - Córrer, esquiar, gimnàstica, jocs de pilota o esports vigorosos regularment.....
 - Entrenament esportiu regular per competició
- Quants cops per setmana realitza les activitats referides en la pregunta anterior?

- Durant els últims 12 mesos

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

- Ha buscat / planificat aquest embaràs? Sí No
- Anoti qualsevol dubte relacionat amb aquesta enquesta:

ANNEX 3

ARTICLES CIENTÍFICS



Berrocal-Zaragoza MI, Fernández-Ballart JD, Murphy MM, Cavallé-Busquets P, Sequeira JM, Quadros EV. Association between blocking folate receptor autoantibodies and subfertility. *Fertil Steril* 2008 Oct 22 (doi:10.1016/j.fertnstert.2008.08.104)

Association between blocking folate receptor autoantibodies and subfertility

The association between blocking folate receptor (FR) autoantibodies and subfertility was investigated in a longitudinal study of women attempting to become pregnant. Seventeen women with subfertility (failure to conceive during 12 menstrual cycles) and 25 control women (women who conceived and went on to have normal pregnancy outcomes) were studied. Subfertility risk was 12 times higher in women with blocking FR autoantibodies compared with those without (odds ratio, 12; 95% confidence interval, 1.9–129.6). (Fertil Steril® 2008; ■ ■ ■. ©2008 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Folate receptor autoantibodies, subfertility, pregnancy

Folate plays an important role in human reproduction (1, 2). It is essential for genomic integrity and DNA methylation (3). Insufficient folate supply during the rapid cell division phase after conception has been associated with neural tube defects (NTDs) (4–6), impaired embryo viability and implantation (7), increased rate of apoptosis in human cytotrophoblastic cells (8), and risk of spontaneous abortion (9). Immunohistochemical evidence of folate receptor (FR) expression in different reproductive tissues of both pregnant and nonpregnant female rats and in different anatomical components of the embryo at different stages of development has been reported, and a specific antiserum capable of blocking the binding of folate to its receptor before conception has been proposed as a cause of infertility (10). Maternal FR autoantibodies capable of blocking folate transport have been reported to be more frequent in women with NTD-affected pregnancies than in controls (11, 12). Blocking FR autoantibodies in children have been associated with cerebral folate deficiency (13, 14), autism (15), and Rett syndrome (16).

Approximately 25% of pregnancies are clinically undetected due to early pregnancy loss (17), and 12% end in spontaneous abortion (18). Subfertility [lower than normal probability of conception during a given menstrual cycle (19)] is another complication associated with the very early stages of conception and human development. The timing

and difficulty in detecting these events complicates the investigation of their etiology, especially in the case of a first-time occurrence.

Blockage of FR by maternal FR autoantibodies during the periconception period could alter folate bioavailability during the primary stages of cellular division and embryogenesis. This could lead to subfertility/early pregnancy loss. The aim of this study was to investigate the association between maternal blocking FR autoantibodies and subfertility.

Women planning pregnancy participated in the PREC (PRE Conception) longitudinal study of maternal nutritional status from preconception throughout pregnancy (Unit of Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Rovira i Virgili, and Unit of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Sant Joan, Reus, Spain [1991–96]) (20–22). Ethics committee approval was obtained, and signed informed consent was provided by the participants in accordance with the Declaration of Helsinki (23). Exclusion criteria were previous diagnosis of infertility or chronic illnesses affecting nutritional status and use of medication interfering with folate metabolism. Data regarding lifestyle, toxic habits, vitamin/mineral supplement, and recent oral contraceptive use were collected, and body mass index (BMI) was recorded.

The collection of a fasting blood sample between days 7 and 12 of the menstrual cycle was scheduled on the first day of that cycle. Samples from the antecubital vein were collected into EDTA-K₂-treated vacutainers, kept at 4°C, and processed within 2 hours of collection. Plasma was stored in aliquots at –20°C. If the participant had not become pregnant during three cycles, another blood sample was collected. Subfertility cases were participants who after providing three preconception blood samples had not become pregnant and who confirmed not being pregnant when contacted to schedule a fourth preconception sample (after 12 menstrual cycles of trying). Seventeen cases of subfertility were detected. Controls were 25 participants

Received May 20, 2008; revised August 6, 2008; accepted August 18, 2008.

This study was supported by the grant nos. ALI 89-0388 and SAF 2005-05086 from the Comision Interministerial de Ciencia y Tecnologia, Spain; the Fundació Caixa Sabadell 2006, Spain; the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias) projects PI051839, G03/140 and RD06/0045 and National Institutes of Health grant no. HD051880.

M.I.B.-Z. has nothing to disclose. J.D.F.-B. has nothing to disclose. M.M.M. has nothing to disclose. P.C.-B. has nothing to disclose. J.M.S. is a consultant for Immco Diagnostics. E.V.Q. is a consultant for Immco Diagnostics.

Reprint requests: Michelle Murphy, Unitat de Medicina Preventiva i Salut Pública, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç, 21, 43201 Reus (Tarragona), Spain (FAX: 34-977-759322; E-mail: michelle.murphy@urv.cat).

ARTICLE IN PRESS

who became pregnant after providing a preconception blood sample and provided further blood samples at weeks 8, 20, and 32 of gestation and at labor and from the umbilical cord from normal term pregnancies.

None of the participants took folic acid supplements during the preconception phase of the study. The study was carried out before the current recommendation for periconceptional folic acid supplementation was in place in Spain. Flour in Spain is not fortified with folic acid.

Testing for blocking autoantibodies against FR was performed at the State University of New York Downstate Medical Center as described elsewhere (11, 13). Briefly, 200 μ L of serum was acidified with 300 μ L of 0.1 molar glycine/HCl, pH 2.5/0.5%, Triton X-100/10 mM EDTA and was added to 12.5 mg of dextran-coated charcoal pellets to remove free folate. After centrifugation, the supernatant was collected and the pH was raised to 7.4 with 62 μ L of 1 M dibasic sodium phosphate. This sample was incubated overnight at 4°C with 0.34 pmol of apo-FR purified from bovine milk. Tritiated (3 H) folic acid was added, and the mixture was incubated for 20 minutes at room temperature. Free 3 Hfolic acid was adsorbed to dextran-coated charcoal, and receptor-bound radioactivity in the supernatant fraction was determined. Blocking autoantibodies prevent the binding of 3 Hfolic acid to FR, and the autoantibody titer is expressed as picomoles of FR blocked/milliliter of plasma. Total fasting plasma homocysteine (tHcy) was determined by the IMx immunoassay (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Abbott Park, IL).

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences, version 15.0 (SPSS, Chicago). Frequency of blocking FR autoantibody occurrence and smoking habits and use of oral contraceptives (dichotomic variables) between cases and controls was compared using the χ^2 -test, and mean age and BMI were compared using analysis of variance. The odds ratio (OR) of having subfertility when positive for blocking FR autoantibodies

compared with being negative for them was estimated by logistic regression analysis adjusting for age, smoking habit, BMI, and tHcy. $P < .05$ was considered statistically significant.

The baseline characteristics summarized in Table 1 did not differ significantly between cases and controls. A total of 83 repeated blood samples collected 10–12 weeks apart were available for cases, and 104 were available for controls. A total of 18/83 samples collected from cases had positive FR autoantibody titers compared with 1/104 samples collected from controls ($P < .001$). At least one positive reading for FR autoantibodies was observed in 29.4% (5/17; mean [SD] titer: 0.88 [0.39] pmol FR blocked/mL plasma) of the subfertility cases compared with in 4% (1/25; (titer: 0.19 pmol FR blocked/mL plasma) of the control group ($P < .05$). Autoantibody titers fluctuated to different degrees in the six women who had tested positive in repeated blood samples 12 weeks apart: 2/7 readings over 23 months, 1/10 readings over 31 months, 3/4 readings over 14 months, 5/6 readings over 15 months, 2/3 readings over 12 months, and 1/2 readings over 3 months were below the assay's detection limit (0.1 pmol FR blocked/mL). The remaining 36 women had negative readings for antibodies on all occasions (up to 7 times, each 10–12 weeks apart). The risk of subfertility was 12 times higher in women with autoantibodies compared with those without (OR, 12; 95% confidence interval [CI], 1.9–129.6; $P < .05$). A total of 5/17 cases went on to become pregnant after between 12 and 19 months of trying. Only one case positive for blocking FR autoantibodies became pregnant after 19 months. She went on to have a term pregnancy with the baby's birth weight between P_{25} and P_{50} .

Approximately 30% of cases of subfertility reported in previous studies were not explained by conventional causes (24, 25). In our sample of Spanish women of reproductive age, we observed that having autoantibodies that block folate transport at the FR level is a significant risk factor for subfertility. Folate cell delivery via the FR is especially important in reproductive processes (26). Impairment of this

TABLE 1
 Baseline (preconception) characteristics of cases and controls for subfertility.

	Cases	Controls
N	17	25
Age in years, mean (SD)	30.52 (3.06)	29.30 (2.52)
BMI in kg/m ² , mean (SD)	23.78 (3.83)	22.94 (2.39)
Smokers, n (%)	7 (41.0)	7 (28.0)
Cigarettes/day, mean (SD)	10.2 (5.7)	9.4 (10.3)
Oral contraceptive ^a user, previous 6 months, n (%)	4 (28.6)	9 (37.5)
tHcy in μ moles/liter, mean (SD) [n]	8.0 ^b (3.1) [15]	8.5 ^b (2.0) [24]

^a Oral contraceptive use during the 6 months before starting the study.

^b Mean of preconception visits.

Berrocal-Zaragoza. Folate receptor antibodies and subfertility. *Fertil Steril* 2008.

ARTICLE IN PRESS

mechanism could affect DNA synthesis and repair and apoptosis and trigger oxidative stress mechanisms. This could lead to impaired gamete quality, implantation, fetus development, and pregnancy maintenance as reported in folate deficiency (27, 28). DNA hypomethylation has also been reported to affect the expression of Cyp19, the key gene of estrogen biosynthesis (29).

The importance of FR in cellular folate uptake and the difficulty in successfully conceiving when FR function is inhibited were previously reported in rats (10). Maternal blocking FR autoantibodies have been associated with developmental problems in the embryo during the very early stages of pregnancy (11). Reduced folate is essential in pre-implantation embryos (7). Conceivably, in the case of subfertility, insufficient, reduced folate during the rapid cell division phase after conception may prevent embryo viability and implantation or pregnancy maintenance (7, 10). We investigated the presence of blocking FR autoantibodies in repeated samples collected longitudinally and at relatively close time intervals. We detected blocking FR autoantibodies both before and during pregnancy and observed that in some cases titers fluctuated to levels below the detection limit. Such fluctuations in antibody titer especially when the titer is low have been observed in other autoimmune conditions (30, 31). Questions as to what triggers FR antibody response and what factors contribute to fluctuations in the titer are fundamental issues pertaining to all autoimmune disorders. Significant decreases in antibody titer were observed in another study on eliminating cow's milk and related products from the diet of children with positive blocking FR autoantibody titers (14). This led to the hypothesis that the production of blocking FR autoantibodies is caused by exposure to the antigen (cow's milk FR) because of a defect in the immunological barrier of the gastrointestinal tract.

Further investigation is required to understand the nature of the association between FR autoimmunity and subfertility and the potential benefits of using immune suppressants, corticosteroids, and high-dose folic acid in this disorder.

Maria Isabel Berrocal-Zaragoza, M.S.^a
Joan D. Fernandez-Ballart, Ph.D.^{a,b}
Michelle M. Murphy, Ph.D.^{a,b}
Pere Cavallé-Busquets, M.D.^c
Jeffrey M. Sequeira, M.S.^d
Edward V. Quadros, Ph.D.^d

^aArea of Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Rovira i Virgili, and ^bCIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, and ^cUnit of Obstetrics and Gynaecology, Hospital Universitari Sant Joan, Reus (Tarragona) Spain; and ^dDepartment of Medicine/Cell Biology, State University of New York Downstate Medical Center, Brooklyn, New York

REFERENCES

1. Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2000;71(Suppl):1295S-303.
2. Tamura T, Picciano MP. Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr* 2006;83:993-1016.
3. Friso S, Choi Sang-Woo. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *J Nutr* 2002;132:2382S-7.
4. Hibbard ED, Smithells RW. Folic acid metabolism and embryopathy. *Lancet* 1965;1:1254-6.
5. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 1976;51:944-50.
6. Kirke PN, Molloy AM, Daly SE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 1993;86:703-8.
7. O'Neill CO. Endogenous folic acid is essential for normal development of preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1998;13:1312-6.
8. Steegers-Theunissen RPM, Smith SC, Steegers EAP, Guilbert LJ, Baker PN. Folate affects apoptosis in human trophoblastic cells. *Br J Obstet Gynaecol* 2000;107:1513-5.
9. George L, Mills JL, Johansson ALV, Nordmark A, Olander B, Granath F, et al. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. *JAMA* 2002;288:1867-73.
10. Da Costa M, Sequeira JM, Rothenberg SP, Weedon J. Antibodies to folate receptors impair embryogenesis and fetal development in the rat. *Birth Defects Res (part A)* 2003;67:837-47.
11. Rothenberg SP, da Costa MP, Sequeira JM, Cracco J, Roberts JL, Weedon J, et al. Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *N Engl J Med* 2004;350:134-42.
12. Blik JB, Rothenberg SP, Steegers-Theunissen RPM. Maternal folate receptor autoantibodies and cleft lip and/or palate. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;93:142-3.
13. Ramaekers VT, Rothenberg SP, Sequeira JM, Opladen T, Blau N, Quadros EV, et al. Autoantibodies to folate receptors in the cerebral folate deficiency syndrome. *N Engl J Med* 2005;352:1985-91.
14. Ramaekers VT, Sequeira JM, Blau N, Quadros EV. A milk-free diet downregulates folate receptor autoimmunity in cerebral folate deficiency syndrome. *Dev Med Child Neurol* 2008;50:346-52.
15. Ramaekers VT, Blau N, Sequeira JM, Nassogne MC, Quadros EV. Folate receptor autoimmunity and cerebral folate deficiency in low-functioning autism with neurological deficits. *Neuropediatrics* 2007;38:276-81.
16. Ramaekers VT, Sequeira JM, Artach R, Blau N, Temudo T, Omazabal A, et al. Folate receptor autoantibodies and spinal fluid 5-methyltetrahydrofolate deficiency in Rett syndrome. *Neuropediatrics* 2007;38:179-83.
17. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340:1796-9.
18. Blohm F, Fridén B, Milsom I. A prospective longitudinal population-based study of clinical miscarriage in an urban Swedish population. *Br J Obstet Gynecol* 2008;115:176-82.
19. Nguyen RHN, Wilcox AJ. Terms in reproductive and perinatal epidemiology. I. Reproductive terms. *J Epidemiol Commun Health* 2005;59:916-9.
20. Murphy MM, Scott JM, McPardlin JM, Fernandez-Ballart JD. The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic acid supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in a longitudinal study. *Am J Clin Nutr* 2002;76:614-9.
21. Murphy MM, Scott JM, Arija V, Molloy AM, Fernández-Ballart JD. Maternal homocysteine before conception and throughout pregnancy predict fetal homocysteine and birth weight. *Clin Chem* 2004;50:1406-12.
22. Murphy MM, Molloy AM, Ueland PM, Fernandez-Ballart JD, Schneede J, Arija V, et al. Longitudinal study of the effect of pregnancy on maternal and fetal cobalamin status in healthy women and their offspring. *J Nutr* 2007;137:1863-7.


ARTICLE IN PRESS

23. Ethical committee of the World Medical Association. Draft code of ethics on human experimentation. *Br Med J* 1964;2:177-80.
24. Linsten AME, Pasker-de-Jong PCM, de Boer EJ, Burger CW, Jansen CAM, Braat DDM, et al. Effects of subfertility cause, smoking and body weight on the success rate of IVF. *Hum Reprod* 2005;20:1867-75.
25. Smick HKA, Amick TS, Evers JLH, Collins JA. The spontaneous pregnancy prognosis in untreated subfertile couples: the Walcheren primary care study. *Hum Reprod* 1997;12:1582-8.
26. Elnakat H, Ratnam M. Role of folate receptor genes in reproduction and related cancers. *Front Biosci* 2006;11:506-19.
27. Ebisch IMW, Thomas CMG, Peters WHM, Braat DDM, Steegers-Theunissen RPM. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update* 2007;13:163-74.
28. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:28.
29. Vanselow J, Pöhlend R, Fürbas R. Promoter-2-derived Cyp19 expression in bovine granulosa cells coincides with gene-specific DNA hypo-methylation. *Mol Cell Endocrinol* 2005;233:57-64.
30. Yu J, Yi L, Bugawan TL, Erlich HA, Barriga K, Hoffman M, et al. Transient antiislet autoantibodies: infrequent occurrence and lack of association with genetic risk factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2421-8.
31. Cheng HM, Chamley L. Cryptic natural autoantibodies and co-potentiators. *Autoimmun Rev* 2008;7:431-4.



Berrocal-Zaragoza MI, Murphy MM, Ceruelo S, Quadros EV, Sequeira JM, Fernández-Ballart JD. High milk consumers have an increased risk of folate receptor blocking autoantibody production but this does not affect folate status in Spanish men and women. *J Nutr* 2009;139 Mar 12 (doi:10.3945/jn.108.102475)

The Journal of Nutrition. First published ahead of print March 12, 2009 as doi: 10.3945/jn.108.102475.

The Journal of Nutrition
Nutritional Immunology 

High Milk Consumers Have an Increased Risk of Folate Receptor Blocking Autoantibody Production but This Does Not Affect Folate Status in Spanish Men and Women^{1,2}

Maria Isabel Berrocal-Zaragoza,^{3,4} Michelle M. Murphy,^{3-5*} Santiago Ceruelo,^{3,4,6} Edward V. Quadros,⁷ Jeffrey M. Sequeira,⁷ and Joan D. Fernandez-Ballart³⁻⁵

³Area of Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine and Health Sciences, and ⁴Institut d'Investigació Sanitària Pere i Virgili, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Tarragona, Spain; ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03), Instituto de Salud Carlos III, Spain; ⁶Àrea Bàsica de Salut El Morell, Institut Català de la Salut, 43760 Tarragona, Spain; and ⁷Department of Medicine/Cell Biology, State University of New York, Downstate Medical Center, Brooklyn, NY 11203

Abstract

Folate receptor (FR)-blocking autoantibodies (FR-autoantibodies) have been reported in women with neural tube defect-affected pregnancies and subfertility and in children with progressive neurodevelopment disorders. We investigated their prevalence and association with folate status and milk intake in adults unexposed to folic acid fortification. A cross-sectional study of a randomly selected representative sample of a Spanish population (aged 18–75 y) stratified by age and gender was performed. Plasma and red cell folate, plasma cobalamin, fasting plasma total homocysteine (tHcy) concentration, methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, and FR-autoantibody titer were determined in blood samples from 787 fasting participants. Lifestyle data were collected and milk intake estimated from a 3-d dietary record. FR-autoantibody prevalence was 7.2% (0.30 ± 0.27 nmol (mean ± SD) FR blocked/L), equally affecting men and women of all ages. Plasma and red cell folate and tHcy did not differ between carriers and noncarriers of FR-autoantibodies. Milk intake was higher in carriers (225 ± 199 g/d) than in noncarriers (199 ± 147 g/d) ($P < 0.01$). The risk of having FR-autoantibodies increased progressively with increasing quintile of milk intake and was significant in the highest quintile (≥ 307 g/d) compared with the lowest (≤ 67 g/d) [odds ratio (OR), 2.41 [95% CI: 1.02, 5.69]; $P < 0.05$; linear trend, $P = 0.02$]. We concluded that FR-autoantibodies occur in men and women of all ages and do not affect indicators of folate status such as plasma and red cell folate and tHcy. Higher milk intake is associated with increased risk of having FR-autoantibodies. *J. Nutr.* 139: 1–5, 2009.

Introduction

Cellular integrity and division, DNA synthesis and methylation, and fasting plasma total homocysteine (tHcy)⁸ all depend on folate status (1–4). Cellular folate availability depends on folate

supply and transport to the cell. Folate-binding proteins (FBP) (5) are one of various transport mechanisms. The folate receptor (FR) is a form of FBP that is attached to the plasma membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor (6). It is widely expressed in tissues such as the choroid plexus for transport of folate across the blood-brain barrier (7). Three different protein isoforms (α , β , and γ) have been described and are expressed in numerous epithelial tissues (8), in the placenta, hematopoietic cells, and mature peripheral blood neutrophils (9–11) and in hematopoietic tissues, the spleen, and bone marrow (12,13), respectively. The gene coding a 4th isoform (δ) has also been described (14).

The presence of autoantibodies capable of binding to the folate binding site of the FR [FR-blocking autoantibodies (FR-autoantibodies)] has been reported in mothers with neural tube defect-affected pregnancies (14–17). They have been associated with subfertility in women (18) and also with progressive neurodevelopment disorders, such as idiopathic cerebral folate

¹ Supported by the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias) projects 00/0954, 03/0870, 05/1839, G03/140 and RD06/0045; the Fundació Caixa Sabadell 2006. Spain and NIH grant no. HD051880.

² Author disclosures: M. I. Berrocal-Zaragoza, M. M. Murphy, S. Ceruelo, E. V. Quadros, J. M. Sequeira, and J. D. Fernandez-Ballar, no conflicts of interest.

⁸ Abbreviations used: BP, folate-binding protein; CFD, cerebral folate deficiency syndrome; CRP, C-reactive protein; FBP, Folate-binding protein; FR, folate receptor; FR-autoantibody, folate receptor-blocking autoantibody; HTL, homocysteine thiolactone; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; OR, odds ratio; tHcy, fasting plasma total homocysteine.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: michelle.murphy@urv.cat.

deficiency syndrome (CFD) (19), Rett Syndrome (20), and autism (21). A high prevalence of specific immune response to different α FR epitopes has been reported in women with breast and ovarian cancer (22).

It is not yet known what triggers the production of FR-autoantibodies. Reduced titers and clinical improvement in children with CFD were reported when they were received a milk-free diet (23). On reintroduction of milk, the average titer tripled. It has also been proposed that the N-homocysteinylation of FR in situations of elevated tHcy could favor the formation of FR-autoantibodies (24).

In this study, our aim was to investigate the presence of FR-autoantibodies in the general population and to investigate their influence on the association between folate status and tHcy and their association with dietary milk intake.

Participants and Methods

This cross-sectional study was carried out in the Unit of Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Rovira i Virgili in collaboration with the health centers from 3 villages in the Tarragona province, Northeast Spain between 1998 and 2002. A representative sample of the population (aged 18–75 y), stratified by age and gender according to the population distribution of these variables, was randomly selected from the town halls' population registers. A letter was sent describing the characteristics of the study, followed by an invitation to participate by telephone applying the relevant exclusion criteria (Fig. 1). Sufficient plasma samples were available from 787 of 812 participants for the FR-autoantibody determinations (Fig. 1). The study was approved by the Sant Joan University Hospital, Reus, Spain and by the Jordi Gol Gorina Foundation ethics committees. All participants provided their signed informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki (25).

Lifestyle and dietary habits. Participants were asked at recruitment whether they used B vitamin supplements. This was an exclusion criterion. Participants were specifically asked again at the time of blood sample collection whether they had taken a vitamin supplement that day. Anthropometric and lifestyle/habits data were collected at a medical check-up. The population studied was characterized by relatively little exposure to folic acid. There is no mandatory fortification of flour with folic acid and grain is milled locally in Spain. Participants completed a 3-d dietary record on nonconsecutive days, including 1 holiday. Subsequently, a dietitian revised their records with them, using photos of household measures and portions to quantify the portions consumed.

Collection of blood samples. Overnight blood samples were collected from fasting participants from the antecubital vein in 10-mL heparin-lithium and EDTA-K₃ and 5-mL EDTA-K₃ vacutainers. The samples were kept at 4°C until they were processed, always within 2 h of collection. Aliquots of plasma and whole blood diluted 1/10 with 10% ascorbic acid solution (for red cell folate determinations) were stored at -80°C until analysis. DNA was extracted from leukocytes.

Biological determinations. Plasma and red cell folate were determined by microbiological assay using *Lactobacillus casei* (26) and plasma cobalamin using *Lactobacillus leichmannii* (27). These determinations were carried out in Professor John M. Scott's laboratory in Trinity College, Dublin, Ireland. tHcy was determined using the IMx fluorescence polarization immunoassay (Abbott Laboratories Diagnostics Division). The methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism (*MTHFR* C677T) was determined as previously described (28). Plasma creatinine was determined by the Jaffe reaction (Química Clínica Aplicada) on the Cobas Mira analyzer (Roche). Plasma C-reactive protein (CRP) concentration (as a marker of inflammation) was determined by turbidimetric immunoassay (29). FR-autoantibody titers were determined as described previously (18). The assay's cut off titer for presence of FR-autoantibodies was ≥ 0.2 nmol FR blocked/L plasma.

2 Berrocal-Zaragoza et al.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the SPSS, version 15.0. Values in the text are means \pm SD. Variables that were not normally distributed were natural log-transformed for the application of parametric statistical tests and in this case geometric mean (interquartile range) is reported. The chi-square test was used to compare frequencies of male gender, *MTHFR* 677T genotype, smokers, alcohol consumers, presence of active inflammation (CRP ≥ 10 mg/L), B vitamin use, breakfast cereal consumers, and proportion in the highest quintile of milk intake between carriers and noncarriers of FR-autoantibodies. Mean age, BMI, plasma cobalamin and folate, red cell folate, tHcy, and milk and milk product intake were compared between carriers and noncarriers of FR-autoantibodies by ANOVA. We investigated whether the blockage of folate transport at the FR by autoantibodies interferes with folate metabolism using multiple linear regression analysis. We hypothesized that tHcy (a biomarker of folate status) would be affected if the blocking autoantibodies were to impede folate transport. We tested this hypothesis in different regression models. All of the models were adjusted for the known confounders of the association between plasma

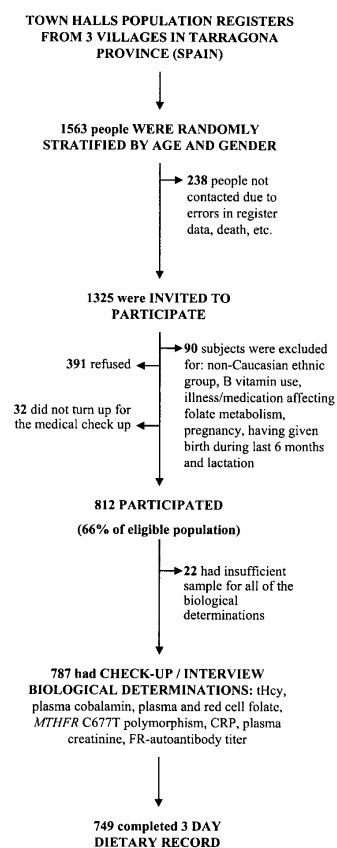


FIGURE 1 Recruitment of participating men and women and available lifestyle and biological variables.

folate and tHcy (gender, age, plasma creatinine, plasma cobalamin, and *MTHFR* 677T). In the presence of FR-autoantibodies blocking one of the folate transport routes, this could impede the reducing effect of plasma folate on tHcy. In the global model, the association between the dependent variable (tHcy) and the independent variable (plasma folate) was also adjusted for the interaction term [(plasma folate) × (FR-autoantibody titer)]. Given that the interaction was significant, plasma folate and FR-autoantibody titer could not be included in the same model. Therefore, we designed different models to investigate the association between plasma folate and tHcy in FR-autoantibody noncarriers and carriers separately and to investigate the association between FR-autoantibody titer with tHcy in carriers. The percentage change in tHcy associated with the specified unit change in each independent (explanatory) variable was calculated as: (the difference between the inverse transformed regression coefficient and 1) × 100.

Multiple logistic regression analysis was used to determine the risk [odds ratio (OR)] of having FR-autoantibodies for consumers in each quintile of milk consumption compared with the lowest and when in the highest quintile of milk consumption compared with the rest of the population. Apart from adjusting for age and gender, other potential confounders of FR-autoantibody production were also considered in the models. Common acute infections inevitably present at different stages in a population sample of varying ages collected throughout the year may have temporarily affected gastrointestinal integrity. The models were adjusted for CRP concentration ≥ 10 mg/L (indicative of the presence of active inflammation) with respect to CRP concentration < 10 mg/L. Homocysteinylolation of lysine residues in the presence of homocysteine thiolactone (HTL), associated with high tHcy, has previously been proposed as a mechanism that might trigger FR-autoantibody production (24). The models were also adjusted for having high tHcy [$\geq P_{90}$ (tHcy ≥ 13.8 $\mu\text{mol/L}$)] with respect to the rest of the population. The significance level for all tests was set at $P < 0.05$.

Results

A total of 7.2% of the population had positive FR-autoantibody titers (0.30 ± 0.27 nmol FR blocked/L of plasma, among carriers). Gender, age, nutritional status variables, and habits in general did not differ between noncarriers and carriers (Table 1). However, milk intake was higher in FR-autoantibody carriers than in noncarriers. Proportionally more FR-autoantibody carriers were in the highest quintile of daily milk intake than noncarriers.

Multiple linear regression analysis investigating the influence of FR-autoantibodies on the association between folate status and tHcy showed that FR-autoantibody titer and plasma folate interacted in their association with tHcy ($P < 0.01$) (model not shown). Due to this evidence that the relationship between plasma folate and tHcy was different at low than at high FR-autoantibody titers, this association was investigated in the absence and in the presence of FR-autoantibodies. In the model including only FR-autoantibody noncarriers, there was a significant inverse association between plasma folate and tHcy (model 1; Table 2). In FR-autoantibody carriers, the magnitude of the inverse association between plasma folate and tHcy was almost one-half that of noncarriers and the association was no longer significant (model 2; Table 2). Also a 1-SD increase in FR-autoantibody titer was associated with an increase in tHcy (model 3; Table 2). However, this association was not significant ($P = 0.118$).

A total of 674/749 (90%) participants that completed the 3-d dietary records reported milk consumption. Multiple logistic regression analysis showed that the risk of having FR-autoantibodies increased with increasing quintile of milk intake compared with being in the lowest quintile of milk intake (Fig. 2). The OR of having FR-autoantibodies by being in the highest quintile of milk intake (307–1247 g/d) compared with the lowest (0–67 g/d) was 2.41 (95% CI: 1.02, 5.69; $P < 0.05$; linear trend, $P = 0.02$). Being in the highest quintile of milk intake compared with the rest of the population, doubled the risk of having FR-autoantibodies (OR: 2.36 [95% CI: 1.27, 4.38]; $P < 0.01$). The association of milk intake with FR-autoantibody titer was significant regardless of whether the type of milk was full fat or reduced fat.

Discussion

The prevalence of FR-autoantibodies was 7.2% in this representative sample of a population of men and women. Higher milk intake was associated with a higher risk of having FR-autoantibodies. There is no mandatory food fortification with folic acid in Spain. Only 1.6% of the population studied took multivitamin supplements. A total of 7.3% reported breakfast cereal consumption. Thus, breakfast cereal consumption in our

TABLE 1 Lifestyle and dietary habits and vitamin status in men and women carriers and noncarriers of FR-autoantibodies¹

	<i>n</i>	Noncarriers	<i>n</i>	Carriers
Males, %	730	47.7	57	52.6
Age, y	730	42.9 \pm 15.3	57	43.1 \pm 15.4
<i>MTHFR</i> 677T genotype, %	724	17.0	57	17.5
Smokers, %	727	34.3	56	42.1
Alcohol consumers, %	713	42.5	56	44.6
BMI, kg/m ²	718	26.9 \pm 5.0	57	27.2 \pm 5.3
Plasma cobalamin, pmol/L	724	373 \pm 149	57	353 \pm 110
Plasma folate, nmol/L	725	13.4 \pm 8.3	57	13.6 \pm 7.6
Red cell folate, nmol/L	726	874 \pm 353	57	912 \pm 409
tHcy, $\mu\text{mol/L}$	726	9.6 (1.4)	57	9.4 (1.4)
FR-autoantibody titer, nmol FR blocked/L	730	0	57	0.30 \pm 0.27
CRP ≥ 10 mg/L, %	704	4.3	52	5.8
B vitamin use, %	730	1.8	57	0
Consumer of breakfast cereals, %	692	7.1	57	10.5
Milk intake, g/d	692	199 \pm 147	57	255 \pm 199 ^a
Milk product intake, g/d	692	102 \pm 80	57	88 \pm 82
High quintile milk intake, %	692	19.2	57	31.6 ^b

¹ Values are means \pm SD, geometric means (interquartile range), or percentages. Letters indicate different from noncarriers: ^a $P < 0.01$; ^b $P < 0.05$.

TABLE 2 Association between plasma folate and tHcy in FR-autoantibody noncarriers and carriers and between autoantibody titer and tHcy in carriers in men and women

Multiple linear regression model ¹	Regression coefficient	Change in tHcy, ^{2%}	F (<i>n</i>)	R ²
1. Noncarriers				
Plasma folate (1 nmol/L)	-0.007	-0.7 ^a		
<i>MTHFR</i> 677TT genotype	0.179	19.6 ^b	48.6 (722) ^b	0.28
Plasma cobalamin (50 pmol/L)	-0.020	-2.0 ^a		
2. Carriers				
Plasma folate (1 nmol/L)	-0.004	-0.4		
<i>MTHFR</i> 677TT genotype	0.165	17.9	3.4 (57) ^b	0.21
Plasma cobalamin (50 pmol/L)	-0.031	-3.1 ^c		
3. Carriers				
1 SD increase in FR-autoantibody titer	0.054	5.5		
<i>MTHFR</i> 677TT genotype	0.165	17.9	3.9 (57) ^b	0.24
Plasma cobalamin (50 pmol/L)	-0.036	-3.5 ^c		

¹ All models were adjusted for gender, age, and plasma creatinine.
² Percentage change in tHcy per specified unit changes in plasma folate and cobalamin and FR-autoantibody titer and for *MTHFR* 677TT genotype with respect to the other genotypes.
³ *n* refers to those with complete data for all of the covariates included in each model. Letters indicate significance: ^a*P* < 0.001; ^b*P* < 0.01; ^c*P* < 0.05.

adult population was lower than recently reported in a different Spanish study of children and young adults (30).

Although folate status was similar in FR-autoantibody carriers and noncarriers, plasma folate and FR-autoantibodies interacted in their association with tHcy. This indicates that although folate has a reducing effect on tHcy in the absence of autoantibodies, their presence interferes with the effect of folate on tHcy. If the blockage of folate transport at the FR level is not sufficiently compensated by another transport mechanism, this might affect folate availability for homocysteine remethylation with a resulting increase in tHcy. The average reduction in tHcy associated with increasing plasma folate was less in carriers than in noncarriers of FR-autoantibodies and no longer significant. Also, an increasing FR-autoantibody titer was associated with increased tHcy, although not significantly (*P* = 0.118). We may have lacked sufficient statistical power due to the small number of FR-autoantibody carriers in our population.

The mean FR-autoantibody titer in our population is considerably lower than previously reported titers that have been associated with pathological conditions such as subfertility, neural tube defect pregnancy, or CFD in infancy (18–21,23). Folate status

has been reported to differ between FR-autoantibody carrier mothers of children with cleft lip and palate abnormalities (tHcy, 12.0 μmol/L; serum folate, 13 nmol/L) and noncarriers (tHcy, 10.4 μmol/L; serum folate, 22.0 nmol/L) (16). Folate status did not differ between carriers and noncarriers of FR-autoantibodies using bivariate analysis. FR-autoantibody presence may only be clinically important in situations/organs with high FR expression due to elevated folate requirements, such as the developing embryo. Under some circumstances, folate requirements may be met by other folate transport routes. The reduced folate carrier, a transmembrane transporter with a higher affinity for reduced folates, is expressed in most cell types and is considered an alternative transport route for folates (31). Other transport systems such as the proton-coupled folate transporter also exist in specific tissues (32). It appears that in the general population, these routes are sufficient to override the effect of the blockage of folate transport at the FR level and at low FR-autoantibody titers.

Ramaekers et al. (23) proposed that repeated exposure of the digestive tract to bovine milk FR could result in the production of FR-autoantibodies. Ninety percent of our population reported milk consumption at a similar level to the American population (33) but inferior to that of other European populations (34). Our results show that consumers of between 307 and 1247 g/d of milk, irrespective of whether it was full fat or not, had double the risk of having FR-autoantibodies compared with the rest of the population. Given that milk consumption was so extensive in our population but only a small minority had FR-autoantibodies, either large amounts need to be consumed to produce the autoantibodies or other unknown factors contribute to the production of this immune response. Bovine milk is rich in FBP (35). Previously, it has been proposed that an immature gastrointestinal immune system might play a role in FR-autoantibody production associated with milk intake in children (23). The Peyer's patches that form an important part of the gastrointestinal mucosal immune system are rich in immune cells. Food-borne antigens transported from the gut lumen by the M cells are presented to the immune system at this point. Tolerance to these is conferred by specialized dendritic cells and regulatory T cells. In addition, secretion of IgA provides additional protection against dietary antigens (36,37). Any aberration in the induction of tolerance during early infancy either due to infection, inflammation, or genetic factors could trigger an immune response that could be stimulated

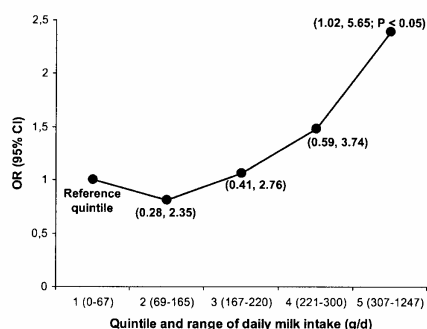


FIGURE 2 Risk (OR [95% CI]) of FR-autoantibodies for each quintile compared with the lowest quintile of milk intake in men and women.

4 Berrocal-Zaragoza et al.

by repeated exposure to the antigen in later life. This seems feasible, because the previously reported FR-autoantibody immune response was observed across the age range from children of 1 y to young adults of 16–19 y (23). The low titer of the antibody in most instances may not be pathologic. However, the antibody titer in the blood likely reflects only a fraction of the antibody, because most of it may be sequestered by tissues expressing this membrane-bound receptor.

An immune response to new autoantigens provoked by the homocysteinylation of the lysine residues of FR in the presence of HTL has been proposed as a possible mechanism by which FR-autoantibodies could be produced (17,24). HTL forms up to 0.28% of tHcy (38) and protein N-homocysteinylation can occur even at HTL concentrations as low as 10 nmol/L (39). We did not measure HTL concentrations in this study. However, in our population, this seems an unlikely cause of FR-autoantibody production, because mean tHcy did not differ between FR-autoantibody carriers and noncarriers. The range of tHcy in each of these groups was 5.8–20.3 and 4.4–33.8 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Furthermore, being in the highest decile of tHcy did not increase the risk of FR-autoantibody production.

We conclude that adult men and women aged 18–75 y can produce FR-autoantibodies. At low concentrations, they do not affect folate status. Elevated milk consumption is a risk factor for producing FR-autoantibodies.

Literature Cited

- Wagner C. Biochemical role of folate in cellular metabolism. In: Bailey LB, editor. Folate in health and disease. 1st ed. NY: Marcel Dekker, Inc.; 1995. p. 23–42.
- Duthie SJ, McMillan P. Uracil misincorporation in human DNA detected using single cell gel electrophoresis. *Carcinogenesis*. 1997;18:1709–14.
- Das PM, Signal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22:4632–42.
- Kang SS, Wong PW, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism*. 1987;36:458–62.
- Henderson GB. Folate-binding proteins. *Annu Rev Nutr*. 1990;10:319–35.
- Antony AC. Folate receptors. *Annu Rev Nutr*. 1996;16:501–21.
- Holm J, Hansen SI, Høier-Mandsen M, Bostad L. High-affinity folate binding in human choroid plexus. Characterization of radioligand binding, immunoreactivity, molecular heterogeneity and hydrophobic domain of the binding protein. *Biochem J*. 1991;280:267–71.
- Elnakat H, Ratnam M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56:1067–84.
- Ratnam M, Marquardt H, Dühring JL, Freisheim JH. Homologous membrane folate binding proteins in human placenta: cloning and sequence of a cDNA. *Biochemistry*. 1989;28:8249–54.
- Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnam M. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer*. 1994;73:2432–43.
- Ross JF, Wang H, Behn FG, Mathew P, Wu M, Booth R, Ratnam M. Folate receptor type beta is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia. *Cancer*. 1999;85:348–57.
- Shen F, Ross JF, Wang X, Ratnam M. Identification of a novel folate receptor, a truncated receptor, and receptor type beta in hematopoietic cells: cDNA cloning, expression, immunoreactivity, and tissue specificity. *Biochemistry*. 1994;33:1209–15.
- Wang H, Ross JF, Ratnam M. Structure and regulation of a polymorphic gene encoding folate receptor type gamma/gamma'. *Nucleic Acids Res*. 1998;26:2132–42.
- Spiegelstein O, Eudy JD, Finnell RH. Identification of two putative novel folate receptor genes in human and mouse. *Gene*. 2000;258:117–25.
- Rothenberg SP, da Costa MP, Sequeira JM, Cracco J, Roberts JL, Weedon J, Quadros EV. Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *N Engl J Med*. 2004;350:134–42.
- Blick JB, Rothenberg SP, Steegers-Theunissen RP. Maternal folate receptor autoantibodies and cleft lip and/or palate. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006;93:142–3.
- Cabrera RM, Shaw GM, Ballard JL, Carmichael SL, Yang W, Lammer EJ, Finnell RH. Autoantibodies to folate receptor during pregnancy and neural tube defect risk. *J Reprod Immunol*. 2008;79:85–92.
- Berrocal-Zaragoza MI, Fernandez-Ballart JD, Murphy MM, Cavallé-Busquets P, Sequeira JM, Quadros EV. Association between blocking folate receptor autoantibodies and subfertility. *Fertil Steril*. 2009. In press.
- Ramaekers VT, Rothenberg SP, Sequeira JM, Opladen T, Blau N, Quadros EV, Selhub J. Autoantibodies to folate receptors in the cerebral folate deficiency syndrome. *N Engl J Med*. 2005;352:1985–91.
- Ramaekers VT, Sequeira JM, Artuch R, Blau N, Temudo T, Ormazabal A, Pineda M, Aracil A, Roelens F, et al. Folate receptor autoantibodies and spinal fluid 5-methyltetrahydrofolate deficiency in Rett syndrome. *Neuropediatrics*. 2007;38:179–83.
- Ramaekers VT, Blau N, Sequeira JM, Nassogne MC, Quadros EV. Folate receptor autoimmunity and cerebral folate deficiency in low-functioning autism with neurological deficits. *Neuropediatrics*. 2007;38:276–81.
- Knutson KL, Krcó CJ, Erskine CL, Goodman K, Kelemen LE, Wettstein PJ, Low PS, Hartmann LC, Kalli KR. T-cell immunity to the folate receptor alpha is prevalent in women with breast or ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:4254–61.
- Ramaekers VT, Sequeira JM, Blau N, Quadros EV. A milk-free diet downregulates folate receptor autoimmunity in cerebral folate deficiency syndrome. *Dev Med Child Neurol*. 2008;50:346–52.
- Taparia S, Gelineau-van Waas J, Rosenquist TH, Finnell RH. Importance of folate-homocysteine homeostasis during early embryonic development. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45:1717–27.
- World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *JAMA*. 1997;277:925–6.
- Molloy AM, Scott JM. Microbiological assay for serum plasma, and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method. *Methods Enzymol*. 1997;281:43–53.
- Kelleher BP, Broin SD. Microbiological assay for vitamin B12 performed in 96-well microtiter plates. *J Clin Pathol*. 1991;44:592–5.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijijmans LA, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995;10:111–3.
- Bertran N, Camps J, Fernández-Ballart J, Murphy MM, Arija V, Ferré N, Tous M, Joven J. Evaluation of a high-sensitivity turbidimetric immunoassay for serum C-reactive protein: application to the study of a longitudinal changes throughout normal pregnancy. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43:308–13.
- van den Boom A, Serra-Majem L, Ribas L, Ngo J, Pérez-Rodrigo C, Aranceta J, Fletcher R. The contribution of ready to eat cereals to daily nutrient intake and breakfast quality in a Mediterranean setting. *J Am Coll Nutr*. 2006;25:135–43.
- Matherly LH. Molecular and cellular biology of the human reduced folate carrier. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001;67:131–62.
- Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*. 2006;127:917–28.
- Beydoun MA, Gary TL, Caballero BH, Lawrence RS, Cheskin IJ, Wang Y. Ethnic differences in dairy and related nutrient consumption among US adults and their association with obesity, central obesity, and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:1914–25.
- Konstantinova SV, Vollset SE, Berstad P, Ueland PM, Drevon CA, Refsum H, Tell GS. Dietary predictors of plasma total homocysteine in the Hordaland Homocysteine Study. *Br J Nutr*. 2007;98:201–10.
- Jones ML, Nixon PE. Tetrahydrofolate are greatly stabilized by binding to bovine milk folate-binding protein. *J Nutr*. 2002;132:2690–4.
- Mason KL, Huffnagle GB, Noverr MC, Kao JY. Overview of gut immunology. *Adv Exp Med Biol*. 2008;635:1–14.
- Allen CA, Torres AG. Host-microbe communication within the GI tract. *Adv Exp Med Biol*. 2008;635:93–101.
- Chwatko G, Jakubowski H. The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma. *Anal Biochem*. 2005;337:271–7.
- Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J*. 1999;13:2277–83.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES


Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009

ANNEX 4


MATERIAL RELATIU A L'ESTUDI NUTCIR

Es va preparar una tarja d'agraïment per cadascuna de les participants i els neus nadons. I un val per un regal, de la empresa tèxtil SEIBE, S.A. de Reus (Tarragona), de forma totalment gratuïta, amb la qual s'ha mantingut la col·laboració des del gener del 2006.



L'equip investigador de l'estudi NUTCIR de la Unitat de Medicina Preventiva i Salut Pública de la URV i el Servei de Ginecologia de l'Hospital Sant Joan de Reus, agraeix a Pepita Nutcir Circas i al seu nadó la seva col·laboració.


La investigació sense la col·laboració de la població no és possible. La vostra participació ha contribuït al millor coneixement del l'embaràs i així aportar millores en la salut de futurs nadons.




Estem segurs que la seva participació en l'estudi NUTCIR contribuirà al millor coneixement de l'evolució de l'embaràs, i que aportarà noves dades a la ciència i així contribuirà a resoldre problemàtiques mèdiques. No tindriem l'ocasió de dur a terme un estudi tant beneficiós per la nostra població sense la col·laboració i, sense ànim de lucre de voluntaris com vostè.

Per donar-los les gràcies, l'empresa **Seibe**, col·labora amb l'equip NUTCIR, amb un regal pel seu nadó, el qual podrà recollir a la botiga de la Plaça del Victor, 6 de Reus, presentant aquest val (sense ell no es farà entrega del regal).

SEIBE
Plaça del Victor, 6
43202-Reus




Universitat Rovira i Virgili

Es va crear amb la col·laboració del Dr. Pere Cavallé-Busquets, ginecòleg responsable de l'estudi NUTCIR de l'HUSJR un tríptic amb les principals recomanacions a seguir durant l'embaràs.



Recomanacions durant la gestació

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Hospital Universitari de Sant Joan Reus

Servei de Ginecologia i Obstetrícia
 Hospital Universitari Sant Joan de Reus
 Unitat de Medicina Preventiva i Salut Pública
 Universitat Rovira i Virgili

Gràcies per la teva participació

NUTCIR

Relació del Retràs de Creixement Intrauterí i la Nutrició. Equip NUTCIR de la Facultat de Medicina. URV

En finalitzar la seva participació en l'estudi NUTCIR, serà agràtia amb un regal pel seu naup per part de l'empresa tèxtil SEIBE que col·labora en aquest projecte.

Plaça Víctor, 6
 43201 Reus


Quan ha d'anar a l'hospital?
 Ha d'anar immediatament a veure el seu metge, o anar a l'hospital, si observa, en qualsevol moment del seu embaràs:

- Hemorràgia pels genitals
- Pèrdua de líquid pels genitals
- Dolor abdominal intens
- Contraccions uterines intenses
- Febre elevada
- Mal de cap molt intens

Quan ha de sospitar que comença el part?

Ha d'anar a l'hospital, per a la possibilitat que estigui començant el part si presenta:

- Contraccions uterines rítmiques, progressivament més intenses i amb una freqüència, almenys de 2-10 minuts durant 30 minuts
- Pèrdua de líquid per la vagina (sospita de ruptura de la bossa de les aigües)
- Pèrdua de sang per la vagina



Quan cal que vagi a la consulta?

A més de les consultes periòdiques recomanades ha de posar en coneixement del seu metge qualsevol anormalia, especialment:

- Vòmits intenses i persistents
- Diarrea
- Dolor a l'ornar
- Mal de cap no habitual
- Inflamació a una regió diferent dels peus i turmells cap al vespre, o a les mateixes zones si no desapareix amb el repòs nocturn

Alletament matern

- Augmenta el vincle entre la mare i el nadó
- Alimentació més higiènica
- La millor inversió per la salut
- És fàcil i relaxant
- Adaptada a les necessitats nutricionals del nadó
- De més fàcil digestió
- Econòmica
- No cal preparar-la
- Mes temps lliure
- Menys risc d'al·lèrgies
- Augmenta el benestar post part físic i psicològic
- Temperatura adequada
- Evita la negligència d'innans
- Ajuda a recuperar la figura més ràpidament
- Natural al 100%

Recomanacions:

- El sostenedor ha de ser còmode, de fibres naturals i amb suport suficient però sense comprimir els pits
- Si volem evitar taques a la roba utilitzar discs absorbents. Recordem de canviar-los sovint per evitar maceracions al mugró



Puerperi

Durant el puerperi, els primers 40 dies us aconsellarem una revisió ginecològica al voltant del mes i mig després del part, i sempre que notau:

- Sagnat superior a una regla normal
- Febre superior a 38°C
- Mal olor del flux vaginal
- Mollis doloros en les mames
- Molesties a l'ornar
- Inflamació o dolor fort en una cama

Recordem que podem anar a la llevadora del PASSIR (CAP de Sant Pere) o de l'ABS que us correspongui després del part o davant de qualsevol complicació o dubte que se us presenti.

Medicaments i Radiació



Evitar prendre qualsevol mena de medicament durant l'embaràs, llevat que hagi estat aconsellada pel seu metge.
 L'exposició a radiacions (raigs X) pot ser perillosa pel seu fill, per la qual cosa només s'haurà de realitzar-se les radiografies necessàries i/o autoritzades pel seu metge.

Higiene

Tingui cura de la seva higiene personal. Es recomana la dutxa diària, ja que durant la gestació augmenta la sudoració i el flux vaginal.
 Extremitat de la boca. És aconsellable que es netegi les dents després de cada menjada. Es recomana que visiti el seu odontòleg per fer-se una revisió i una neteja bucal.



Vestit i Calçat

Utilitzi vestits còmodes i amples. El calçat ha de ser confortable; eviti tant les sabates amb taló alt com les excessivament planes. La fàtica pot afectar la musculatura abdominal; per tant, no cal fer-la servir, llevat que el seu metge se la recomani.
 Les mitges i els mitjons que causin compressió local de la cama poden afavorir el desenvolupament de varus. No són aconsellables.

Treball

Pot desenvolupar la feina habitual, sempre que no li causi fatiga física o psíquica excessiva, fins al vuitè mes de gestació. A partir d'aquest moment ha de reduir l'activitat física, i es recomana de deixar de treballar en les últimes setmanes de gestació. No és aconsellable que en el seu treball utilitzi productes tòxics o estigui exposada a radiacions.

Conducció



Part inferior:
 Per sota de l'abdomen tan avall com sigui possible

Part superior:
 Entre els dos pits

No s'ha de passar la part inferior del cinturó per sobre de l'abdomen

Esport

Durant l'embaràs la dona sana té una tolerància menor a l'esforç físic. Convié practicar un exercici moderat. S'aconseja el passeig, la natació i els exercicis aprofundits en els cursos d'educació física. No es recomana la pràctica d'esports violents, de competició o que causin fatiga.



Viatges

Els viatges en general no estan contraindicats. No és aconsellable desplaçar-se a llargs amb excursions, serveis sanitaris. Cap al final de la gestació ha d'evitar els viatges llargs. No estan contraindicats els viatges amb avió.



Relacions sexuals

Si el seu embaràs cursa amb normalitat, no cal modificar o interrompre els seus hàbits sexuals, sempre que no us resultin molestos.
 Quan el ventre comença a créixer el coït en la postura clàssica pot resultar incòmode; si és així, ha d'adoptar posicions més còmodes. Ha d'evitar les relacions sexuals quan existeix hemorràgia genital, amenaça de part prematura o ruptura de la bossa de les aigües. S'aconseja evitar el coït en les 2 o 3 últimes setmanes de l'embaràs.



Canvis esperats al vostre organisme

Encara que l'embaràs és una etapa normal de la seva vida, pot notar que s'estableixen canvis en el seu organisme:

- Pot sentir-se més sensible i emotiva, cansada i fatigada.
- Observar una major pigmentació de la pell i, a vegades, l'aparició d'estríes.
- Les mames augmenten de mida, els mugrons són més sensibles i la llet pot aparèixer abans d'acabar l'embaràs. No és aconsellable la manipulació del mugró.
- Les nàusees i els vòmits, sobretot als matins, són freqüents durant els tres primers mesos d'embaràs; així com la creixent i el creixent de l'estómac a la segona meitat de l'embaràs. Consulti el seu metge en tots els casos.
- El restringiment i les hemorroides són freqüents. Procuri fer una dieta rica en fibra, sucus i fruita. No prengui laxants sense consultar al seu metge.
- Les varus són freqüents sobretot al final de la gestació. Eviti la roba ajustada. No estigui a curada i ureta durant períodes llargs. Descansi amb les cames alçades. És aconsellable utilitzar mitges elàstiques principalment al final de l'embaràs, quan la dona gestant modifica la seva postura corporal pel creixement del fetus. Procuri utilitzar senyals amb suport recte, evitar càrregues pesants i fer servir un matriàtils dur pel seu descans.
- Durant l'embaràs augmenta la necessitat i freqüència d'orinar. Això pot fer-la lletar de nit per anar al lavabo.

Prevenició de malalties infeccioses transmissibles al fetus

Existen algunes infeccions que quan afecten la mare durant l'embaràs poden ser perilloses pel fetus. És recomanable que utilitzi algunes mesures per evitar possibles mecanismes de contagi:

- Ha de tenir precaució en el contacte amb gats i altres animals domèstics. Sobretot al netejar les seves deposicions.
- No mengi carn poc cuinada, aus crus, ni embotits poc curats. Ha de rentar-se les mans després de manipular la carn crua a la cuina i ha d'evitar menjar verdura fresca sense rentar-la adequadament.
- Ha d'evitar el contacte amb malalts infecciosos de qualsevol tipus i no exposar-se al risc de contraure una malaltia infecciosa de transmissió sexual. En aquests casos es aconsella l'ús del preservatiu.

Cursos de preparació maternal

És una activitat que es proposa perquè la parella pugui viure aconseguint col·laborar en l'embaràs i el part del seu fill.
 Amb la informació donada en els cursos s'intenta disminuir la por al part. També el desenvolupament de l'embaràs, el part i els mètodes d'assistència, així com l'atenció al nadó. D'altra banda, s'ensenyava la forma pràctica de relaxar-se i de respirar adequadament en cada moment del part, per tal d'ajudar en la seva evolució i disminuir el dolor.



La Unitat Materno-Infantil de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus organitza sessions informatives per quan arribi el moment del part. Si esteu interessades en participar-hi pregunteu a les administratives de la tercera planta del dispensari.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

AUTOANTICOSSOS CONTRA RECEPTORS DE FOLAT I ESTAT EN FOLATS A LA POBLACIÓ GENERAL, DURANT L'EMBARÀS
I EFECTE SOBRE LA SUBFERTILITAT EN DONES

Maria Isabel Berrocal Zaragoza

ISBN:978-84-692-3233-0/DL:T-940-2009