

**ANÁLISIS DE LOS BENEFICIOS Y RIESGOS DE
LA FORTIFICACIÓN DE HARINA DE TRIGO
CON ÁCIDO FÓLICO EN CHILE**



**TESIS DOCTORAL
CECILIA CASTILLO LANCELLOTTI
2014**



UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud
Grupo de Investigación en Nutrición Comunitaria y Estrés Oxidativo

y



Grupo CB12/03/30038

**ANÁLISIS DE LOS BENEFICIOS Y RIESGOS DE LA
FORTIFICACIÓN DE HARINA DE TRIGO CON ÁCIDO FÓLICO
EN CHILE**

Memoria para optar al Grado de

Doctora por la *Universitat de les Illes Balears*

Programa de Doctorado Interuniversitario en Nutrición Humana
con Mención hacia la Excelencia del Ministerio de Educación y Ciencia

(ref. MEE2011-0222)

del *Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud*

Presentada por

CECILIA CASTILLO LANCELLOTTI

Palma de Mallorca, 2014

La interesada

Cecilia Castillo Lancellotti

Con el beneplácito de los Directores

Dr. Josep Antoni Tur Marí
Catedrático de Universidad,
Área de Fisiología

Dr. Ricardo Uauy Dagach
Professor Public Health Nutrition
London School of Hygiene and Tropical
Medicine, University of London

DEDICATORIA

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.”

Mahatma Gandhi

A mi esposo e hijos por su apoyo cariñoso e incondicional, así como por su permanente incentivo para terminar esta tesis doctoral en esta etapa tardía de la vida.

A MI FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis directores de tesis: al Dr. Josep Antoni Tur Marí, por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su tutela, su labor de supervisión, apoyo y confianza en la realización de este trabajo siendo parte del Grupo de Investigación en Nutrición Comunitaria y Estrés Oxidativo de la Universidad de las Islas Baleares, la cual forma parte además del Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), ref. núm. CB12/03/30038, la Red EXERNET y el Centre Català de la Nutrició (Institut d'Estudis Catalans). También al Dr Ricardo Uauy Dagach por incentivar-me a desarrollar una tesis doctoral y por su constante incentivo y apoyo técnico.

Además agradecer a los Doctores Gonzalo Valdivia, Paula Margozzini y al Profesor Oslando Padilla del Departamento de Salud Pública de la Pontificia Universidad Católica de Chile por su generosidad y apoyo técnico para terminar esta tesis doctoral.

Índice

Abreviaturas/ <i>Abbreviations</i>	V
Resumen /<i>Summary</i>	XIII
Lista de artículos / <i>List of original papers</i>	XVII
I. Introducción	1
1. Folato y ácido fólico. Bioquímica nutricional	3
1.1 Estructura del folato y ácido fólico	3
1.2 Metabolismo del folato y función bioquímica	7
1.2.1 Catabolismo de la histidina	7
1.2.2 Interconversión de serina y glicina	7
1.2.3 Síntesis de timidilato	8
1.2.4 Síntesis de purina	8
1.2.5 Síntesis de metionina	9
1.3 Compartimentalización del folato	13
1.4 Absorción, transporte y catabolismo del folato	14
1.4.1 Absorción	14
1.4.2 Transporte	15
1.4.2.1 Transporte riñón	16
1.4.2.2 Transporte cerebro	16
1.4.2.3 Transporte eritrocito	16
1.4.2.4 Transporte embarazo	17
1.4.3 Catabolismo del Folato	17
1.5 Fuente dietaria de folatos	19
2. Efectos en salud de los folatos	20
2.1 Defectos del tubo neural	20
2.1 Anemia	24
2.3 Alteraciones Neurológicas	26
2.4 Cáncer	28
2.5 Enfermedad Cardiovascular	35
3. Indicadores bioquímicos del folato	38

3.1 Indicadores directos	38
3.1.1 Folato eritrocitario	38
3.1.2 Folato plasmático	40
3.1.3 Ácido fólico sérico	41
3.2 Indicadores funcionales	41
3.2.1 Homocisteína sérica/plasmática	41
3.3 Ensayos para evaluar indicadores bioquímicos	43
3.3.1 Determinación de folatos	43
3.3.2 Determinación de homocisteína	46
4. Requerimiento del folato	47
4.1 Biodisponibilidad	47
4.2 Ingesta Dietética Recomendada	49
4.2.1 Definiciones Generales	49
4.2.1.1 Requerimiento Medio Estimado	49
4.2.1.2 Ingesta Dietética Recomendada	50
4.2.1.3 Ingesta Adecuada	50
4.2.1.4 Límite Superior Tolerable Ingesta	50
4.2.1.5 Máxima Ingesta en que no se observan efectos adversos	50
4.2.1.6 Mínima Ingesta en que no se observan efectos adversos	50
4.3 Ingesta Dietética Recomendada para Folato	51
4.3.1 Equivalentes Dietarios de Folato	51
4.3.2 Niños 0-11 meses	51
4.3.3 Niños mayores de un año y adolescentes	52
4.3.4 Adultos mayores de 19 años	52
4.3.5 Embarazadas	52
4.3.6 Lactancia	53
4.3.7 Límite superior tolerable ingesta para ácido fólico	53
5. Fortificación de alimentos para optimizar la salud	56
5.1 Ventajas y limitaciones de la fortificación de alimentos	57
5.2 Fortificación de alimentos en Chile	61

5.3 Antecedentes de la fortificación de alimentos con ácido fólico	63
5.4 Fortificación de harina de trigo con ácido fólico en Chile	66
5.5 Evaluación económica de la fortificación de harina de trigo con ácido fólico	69
6. Análisis de riesgo para nutrientes	73
II. Hipótesis y Objetivos	81
1. Hipótesis	83
2. Objetivo General	85
3. Objetivos Específicos	85
III. Material y Métodos	87
1. Planteamiento General	89
1.1 Identificación de los beneficios y riesgos de la suplementación con ácido fólico	89
1.2 Análisis de los beneficios y riesgos de la fortificación con ácido fólico en Chile a nivel poblacional	89
2. Métodos	90
2.1 Identificación de los beneficios y riesgos de la suplementación con ácido fólico	90
2.2 Análisis de los beneficios y riesgos de la fortificación con ácido fólico en Chile a nivel poblacional	90
2.2.1 Nivel de ácido fólico en harina de trigo	90
2.2.2 Estimación de ingesta diaria de folato total	91
2.2.3 Prevalencia de defectos del tubo neural en Chile	91
2.2.4 Beneficios y riesgos de la fortificación en adultos mayores	92
2.2.4.1 Muestra	92
2.2.4.2 Aspectos éticos y legales	93
2.2.4.3 Laboratorio	93
2.2.4.4 Variables independientes	93
2.2.4.5 Variable dependiente	93
2.2.4.6 Variables de control	94
2.2.4.7 Análisis estadístico	95

IV. Resultados y Discusión	99
Publicaciones	101
Manuscrito I. Fortificación de la harina de trigo con ácido fólico en Chile. Consecuencias no intencionadas.	103
Manuscrito II. Folatos y riesgo de cáncer de mama. Revisión sistemática.	127
Manuscrito III Revisión Sistemática del efecto de los folatos y otros nutrientes relacionados en la función cognitiva del adulto mayor.	157
Manuscrito IV. Suplementación con ácido fólico y prevención de recurrencia de adenomas colorrectales; revisión sistemática.	195
Manuscrito V. Impact of folic acid flour fortification on neural tube defects: A systematic review.	223
Manuscrito VI. Revisión Sistemática: folatos y vitamina B ₁₂ sérica en adultos mayores chilenos y estimación indirecta de ingesta de folatos.	255
Manuscrito VII. Nivel sérico de Folato y Vitamina B ₁₂ en adultos mayores chilenos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud ENS 2009-2010.	279
Manuscrito VIII. Serum Folate, Vitamin B ₁₂ and cognitive impairment in Chilean older adults.	303
Comunicaciones a Congresos	327
Serum folate and vitamin B ₁₂ in the elderly. Chilean National Health Survey 2009-10.	329
V. Recapitulación	331
1. Revisiones Sistemáticas. Beneficios y Riesgos de folatos y ácido fólico	333
2. Fortificación de harina de trigo con ácido fólico en Chile	339
2.1 Nivel de ácido fólico en harina de trigo	339
2.2 Nivel de folato sérico en población chilena	341
2.3 Estimación indirecta de la ingesta de folatos en Chile	343
3. Beneficios y riesgos de la fortificación con ácido fólico en Chile	344
3.1 Prevalencia de defectos del tubo neural en Chile	344
3.2 Deterioro de la función cognitiva en adultos mayores chilenos	345
VI. Conclusiones	351
VII. Bibliografía	357

Abreviaturas (español e inglés)

Organizaciones, otras entidades y actividades

ISP Instituto de Salud Pública de Chile

MINSAL Ministerio de Salud de Chile

OMS Organización Mundial de la Salud

Organizations, other entities and activities

BRAFO	Benefyt Risk Analysis for Food
FAO	Food and Agriculture of the United Nations
FFI	Flour Fortification Initiative
GAIN	Global Alliance for Improved Nutrition
MI	Micronutriente Initiative
QALIBRA	Quality of Life Integrate Benefit and Risk Analysis
UNICEF	United Nations Children’s Fund

Términos Técnicos

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AICAR	Aminoimidazol-4- Carboxamida Ribonucleótido
AMM	Ácido Metil-Malónico
ATP	Adenosin-Trifosfato
AVACs	Años de Vida Ajustados por Calidad de Vida
AVADs	Años de Vida Ajustados por Discapacidad
AVE	Accidente Vascular Encefálico
BHMT	Betaína Homocisteína S-Metiltransferasa
CAFP	Cuestionario de Actividad Funcional de Pfeffer
-CH₂	Metileno
Co	Cobalto
COOH	Carboxilo
CpG	Islas Citosina-Guanina
DHF	Dihidrofolato
DHFR	Dihidrofolato-reductasa
dTMP 5	Monofosfato-deoxitimidina
dUMP	Monofosfato Deoxiuridato
EC	Enfermedad Coronaria
ECV	Enfermedad Cardiovascular
EDF	Equivalente Dietaria de Folato
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleótido
FADH₂	Flavin-Adenin-dinucleótido reducido
FIGLU	Ácido formimino-glutámico

FPGS	Folil-Poliglutamato-Sintetasa
GAR	Glicinamida Ribonucleótido
GC/MS	Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas
GCP II	Folil-Poliglutamto-Carboxipeptidasa II
GGH	Gamma-Glutamil Hidrolasa
gUMTP	5 Monofosfato-deoxiuridina
IA	Ingesta Adecuada
ICAM-1	Molécula de Adhesión Endotelial Intercelular
IDR	Ingesta Dietética Recomendada
IDR	Ingesta Dietética Recomendada para Folatos
IMP	Inosin-Monfosfato
LC-MS/MS	Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrofotometría de Masas
LSTI	Límite Superior Tolerable de Ingesta
MMMSE	Mini Examen del Estado Mental Modificado
MS	Metionina Sintetasa
MTHFR	Metil-Tetrahidrofolato-Reductasa
N	Nitrógeno
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido Fosfato
-NH₂	Amina
NEDU	Nivel Educativo
PABA	Ácido Para-Aminobenzoico
pABG	Para-Aminobenzoil Glutamato
PCP	Polaridad Celular Plana
RAP	Riesgo Atribuible Poblacional

RME	Requerimiento Medio Estimado
SAH	S-Adenosil-Homocisteína
SAHH	S-Adenosil-Homocisteína Hidrolasa
SAM	S-Adenosil-Metionina
SHMT	Serina Hidroximetil Sintetasa
THF	Tetrahidrofolato
TMP	Timidilato Monofosfato
TS	Timilidato-Sintetasa
VCAM-1	Molécula de Citoadhesión Vascular 1

Technical terms

AI	Adequate Intake
EAR	Estimated Average Requirement
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level
NOAEL	No observed Adverse Effect Label
RDA	Recommended Dietary Allowance
UL	Tolerable Upper Level



ANÁLISIS DE LOS BENEFICIOS Y RIESGOS DE LA FORTIFICACIÓN DE HARINA DE TRIGO CON ÁCIDO FÓLICO EN CHILE

Tesis doctoral, Cecilia Castillo Lancellotti, Grupo de Investigación en Nutrición Comunitaria y Estrés Oxidativo, Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud, Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca, y CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBERobn CB12/03/30038), Instituto de Salud Carlos III, España.

Resumen

La fortificación mandataria de harina de trigo con ácido fólico ha sido implementada en numerosos países con el objetivo de reducir el número de recién nacidos con defectos del tubo neural (DTN). Chile implementó esta intervención nutricional a partir del año 2000.

El ácido fólico es la vitamina más utilizada en alimentos fortificados y suplementos vitamínicos y corresponde a una forma más oxidada que la natural. Actúa como cofactor y co-sustrato para la metilación biológica y la síntesis de ácidos nucleicos, transportando unidades activas monocarbonadas necesarias para la síntesis de purinas y timidilato, así como para la síntesis, replicación y reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN).

La revisión sistemática de estudios no controlados de diferentes países que fortifican harina con ácido fólico muestra una importante reducción de DTN. En Chile esta reducción alcanza a 55% considerando un período de diez años a partir del inicio de la fortificación.

Chile monitorea el nivel de ácido fólico en harina de trigo desde el año 2005. El análisis de esta información muestra una importante dispersión del nivel de ácido fólico cuando se compara con lo establecido en la norma chilena (2.2 mg/kg). Entre los años 2005 y 2008 destaca que 50% de las muestras presentaba niveles inferiores a lo establecido por norma, 10% no contenía ácido fólico y 30% presentaba niveles muy elevados.

La estimación indirecta de la ingesta de folatos totales alcanza, en algunos grupos de adultos mayores, niveles superiores al Límite Superior Tolerable de Ingesta para adultos (>1000 $\mu\text{g}/\text{día}$) que se refleja en elevados niveles de folato sérico. Estos alcanzan

niveles suprafisiológicos ($>20\mu\text{g/L}$) en 50% de adultos mayores estudiados, siendo el déficit de folato sérico casi inexistente.

Una extensa información se ha publicado durante los últimos años en relación a riesgos en salud derivado de la suplementación con ácido fólico, sugiriendo un aumento del riesgo de algunos tipos de cáncer cuando se consume en altas dosis, por tiempo prolongado y asociado a la existencia de lesiones preneoplásicas previas, entre ellos, un aumento en la recurrencia de adenomas colorrectales y de cáncer de colon, sin embargo la revisión sistemática desarrollada no permite concluir la existencia de mayor riesgo. En relación con el cáncer de mama, no puede concluirse que existan beneficios o riesgos asociados a dicha suplementación, observándose sólo un efecto protector en aquellas bebedoras de alcohol y portadoras de algunos polimorfismos de enzimas del ciclo del folato.

El folato y otras vitaminas relacionadas, especialmente vitamina B_{12} , cumplen además una importante función en el crecimiento, diferenciación, desarrollo y reparación cerebral, así como también, en la cognición, encontrándose que la suplementación mejora la función cognitiva cuando los niveles de folato sérico iniciales son bajos. En adultos mayores chilenos, cuando los valores de folato sérico son bajos y los niveles de vitamina B_{12} elevados, el incremento de una unidad de folato sérico ($1\ \mu\text{g/L}$) disminuye el riesgo de deterioro cognitivo; en cambio, el aumento de una unidad de folato sérico cuando los niveles son elevados y el nivel de vitamina B_{12} bajo aumenta el riesgo.

En resumen, la fortificación universal de harina de trigo con ácido fólico en Chile ha sido una intervención nutricional exitosa cumpliendo con el objetivo de reducir la prevalencia de los defectos del tubo neural, determinando un beneficio para la salud y calidad de vida de los recién nacidos, pero también ha determinado un incremento importante de la ingesta de folatos totales y de folato sérico, especialmente en adultos mayores, sugiriendo revisar los niveles de fortificación que prevengan el mayor riesgo de deterioro de la función cognitiva observado en ambos extremos de la distribución de folato sérico.



ANALYSIS OF THE BENEFITS AND RISKS OF FOLIC ACID WHEAT FLOUR FORTIFICATION IN CHILE

PhD Thesis, Cecilia Castillo Lancellotti, Research Group on Community Nutrition & Oxidative Stress, Department of Fundamental Biology and Health Sciences, University of the Balearic Islands, Palma de Mallorca, and CIBER of Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBERobn CB12/03/30038), Carlos III Health Institute, Spain.

Summary

Mandatory fortification of wheat flour with folic acid has been implemented in many countries in order to reduce the number of newborns with neural tube defects (NTDs). Chile has implemented this nutritional intervention since 2000.

Folic acid is the most commonly used in fortified foods and supplements. Folate acts as co-factors and co-substrates for methylation, biological synthesis of nucleic acids being essential for DNA replication and repair.

The systematic review of uncontrolled studies from different countries that fortified flour with folic acid shows a significant reduction in NTD. In Chile this reduction was 55 % within period of ten years from the beginning of flour fortification.

Chile monitors wheat flour folic acid levels since 2005. Analysis of these data in the flour samples shows an important dispersion level when compared with the established in the Chilean rule (2.2 mg/kg). Between 2005 and 2008, 50% of samples had less folic acid that established by law, 10% did not contain folic acid, and 30 % had very high levels.

Indirect estimation of total folate intake reached higher levels than adult folic acid Upper Level (>1000 mg/day) in some elderly people, which is related to the high serum folate level. Fifty percent of older adults reached supraphysiological levels (>20 µg/L) with no serum folate deficiency.

An extensive literature has been lately published related to health risks derived from folic acid supplementation, suggesting an increased risk of some cancers when it is consumed in high doses, for prolonged periods and associated with preneoplastic lesions, an increase in the recurrence of colorectal adenomas and colon cancer, but it cannot be established that supplementation with folic acid would have benefits on the

recurrence of colorectal adenomas or cancer prevention. It cannot be also concluded that folic acid supplementation would have benefits or risks on breast cancer. Its protective effect is only observed in women who drank alcohol and are carriers of some enzyme polymorphisms of folate cycle.

Folate and related vitamins, especially vitamin B₁₂, play an important role in growth, differentiation, brain development and repair, as well as, in cognition, finding that supplementation improves cognitive function when initial serum folate levels are low. In elderly Chileans, when serum folate values are low and vitamin B₁₂ levels are high, each one unit (1 µg/L) increase of serum folate decreases the risk of cognitive impairment; however, the one unit increase when serum folate levels are high and the low level of vitamin B₁₂ increases the risk.

In summary, the universal wheat flour folic acid fortification in Chile has been a successful nutritional intervention that has met its goal of reducing the prevalence of NTD determining a benefit to the health and quality of life of newborns, but it has also led to an increase in the intake of total folate and serum folate, especially in older adults, suggesting to reassess folic acid fortification level to prevent the increased risk of impaired cognitive function observed at both extremes of serum folate distribution.

Lista de artículos originales

- I. Castillo C, Tur JA, Uauy R. Flour fortification with folic acid in Chile. Unintended consequences. *Rev Med Chil* 2010;138(7):832-840.
- II. Castillo-L C, Tur JA, Uauy R. Folate and breast cancer risk: a systematic review. *Rev Med Chil* 2012;140(2):251-260.
- III. Castillo Lancellotti C, Tur Marí JA, Uauy Dagach R. Effect of folate and related nutrients on cognitive function in older people; systematic review. *Nutr Hosp* 2012;27(1):90-102.
- IV. Castillo-Lancellotti C, Tur Marí JA, Uauy Dagach R. Folic acid supplementation and colorrectal adenoma recurrence: systematic review. *Nutr Hosp* 2012;27(1):13-21
- V. Castillo-Lancellotti C, Tur JA, Uauy R. Impact of folic acid fortification of flour on neural tube defects: a systematic review. *Public Health Nutr* 2012;31:1-11.
- VI. Castillo-Lancellotti C, Uauy R, Tur JA. Folatos y vitamina B₁₂ sérica en adultos mayores chilenos. (Remitido para su publicación).
- VII. Castillo Lancellotti C, Margozzini P., Valdivia G, Padilla O, Uauy R, Rozowski J, Tur JA. Nivel sérico de Folato y Vitamina B₁₂ en adultos mayores chilenos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud ENS 2009-2010. *Rev Med Chil* 2013;141(9):1107-1116.
- VIII. Castillo Lancellotti C, Margozzini P, Valdivia G, Padilla O, Rozowski J, Uauy R, Tur JA. Serum Folate, Vitamin B12 and cognitive impairment in Chilean older adults. (Remitido para su publicación)

I. Introducción

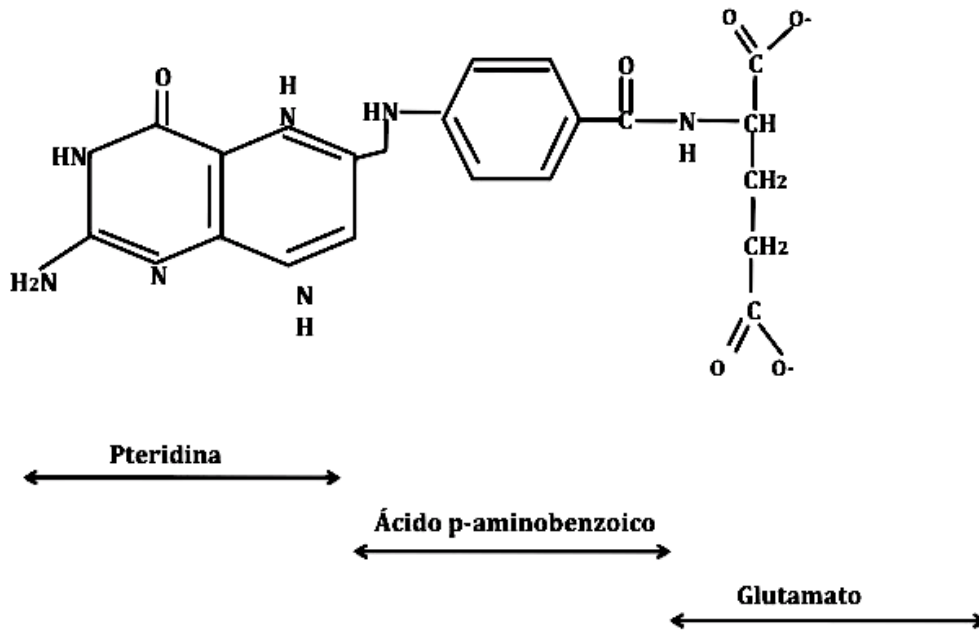
1. Folato y ácido fólico. Bioquímica Nutricional

1.1 Estructura del folato y ácido fólico

La identificación de los folatos se inició en el año 1931, cuando la investigadora Lucy Wills demostró que la anemia macrocítica, frecuente en mujeres hindúes durante la última etapa del embarazo, tenía una buena respuesta al tratamiento con extracto de levadura (1). En 1941, este factor hematopoyético contenido en la levadura fue aislado de la espinaca y denominado ácido fólico, nombre que deriva del latín *folium* (hoja) (2), aludiendo al alto contenido de este nutriente en las hojas verdes. El ácido fólico, un folato de origen sintético, fue desarrollado por primera vez por los Laboratorios Lederle en el año 1943 (2). Actualmente, el término folato (vitamina B₉), un compuesto hidrosoluble, es utilizado para denominar a una gran cantidad de componentes que tienen que tienen una estructura química similar, así como también, propiedades nutricionales semejantes (3).

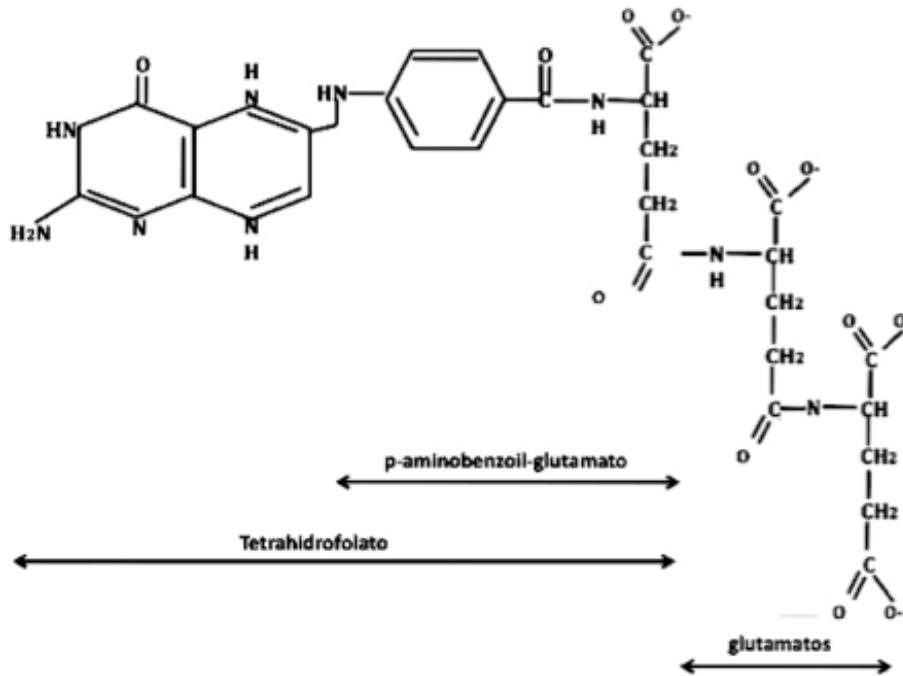
El ácido fólico corresponde a un ácido pteroil-monoglutámico, una forma de pteroilglutamato más oxidada que los folatos naturales. El ácido fólico está formado por un anillo de pteridina conjugado con el ácido para-amino-benzoico (PABA) a través de un puente de metileno (CH₂). A su vez, el ácido PABA se encuentra unido con un residuo glutámico por medio de una unión peptídica. El ácido glutámico aporta la amina (-NH₂) y el ácido PABA el grupo carboxilo (COOH). El ácido fólico es la forma de vitamina más frecuentemente utilizada en alimentos fortificados (harinas, pan, arroz cereales para el desayuno y pasta) y en suplementos vitamínicos (4) (Figura 1).

Figura 1. Estructura del ácido fólico



A diferencia del ácido fólico, los folatos que se encuentran presentes naturalmente en los alimentos corresponden a pteroil-poliglutamatos. Estos difieren entre sí, en la longitud, en el estado de reducción del grupo pteroil, en la naturaleza de los sustituyentes del anillo de pteridina y en el número de residuos de glutamato unidos a este grupo (Figura 2).

Figura 2. Estructura del tetrahidrofolato-triglutamato



El fragmento monocarbonado que transportan los folatos puede presentar diferentes grados de oxidación y estar unido a sus átomos de nitrógeno N-5, N-10 (denominados N⁵ y N¹⁰). La forma más reducida transporta un grupo metilo, mientras que la forma intermedia transporta un grupo metileno. A su vez, las formas más oxidadas pueden transportar grupos formilos, formimino o metenilo (Tabla 1) (5).

Los fragmentos monocarbonados transportados por el tetrahidrofolato son interconvertibles. El 5-10-metilen-tetrahidrofolato (5-10-metilen-THF) se puede reducir a 5-metil-tetrahidrofolato (5-metil-THF) u oxidar a 5-10-metenil tetrahidrofolato (5-10-metenil-THF). El 5-10 metenil tetrahidrofolato (5-10-metenil-THF) puede ser convertido a 5 formimino-tetrahidrofolato (N5-formimino-THF), ambos con el mismo grado de oxidación. El 10-formil-tetrahidrofolato (10-formil-THF) se puede sintetizar también a partir de tetrahidrofolato (THF), formiato y ATP. La diversidad de reacciones que envuelven estas unidades monocarbonadas resulta entonces, de la habilidad del tetrahidrofolato (THF) de actuar como coenzima para transportar estas unidades en

diferentes estados de oxidación y de la capacidad de las células de interconvertir rápidamente estas formas (5).

Las formas naturales más abundantes contienen entre una a seis moléculas adicionales de glutamato que se unen a uno de los péptidos ligados al gamma-carboxilo del glutamato. Estos se encuentran naturalmente en alimentos de origen vegetal, tales como verduras de hoja verde, frutas, leguminosas, semillas, así como también, en las vísceras de animales, especialmente en el hígado, e incluyen al 5-metil-THF, 5-formil-THF, 10-formil-THF, 5,10-metilen-THF, 5,10-metenil-THF, 5-formimino-THF, THF y el dihidrofolato (DHF) (6).

El hombre y los mamíferos, en general, son incapaces de sintetizar folatos, a excepción de la síntesis *de novo* de la flora intestinal, algunos de los cuales terminan siendo incorporados a los tejidos (7). Los mamíferos pueden sintetizar todos los componentes de los folatos, pero no logran acoplarlos debido a la inexistencia de la enzima requerida para unir el anillo de pteridina con la molécula de PABA. De esta manera, los requerimientos diarios de folatos deben ser obtenidos a través de la dieta o de suplementos vitamínicos (8).

Tabla 1. Grupos de un carbono (monocarbonados) transportados por tetrahidrofolato.

	Grupo	
	Fórmula	Nombre
Más reducido (= metanol)	-CH ₃	Metilo
Intermedio (= formaldehído)	-CH ₂ _	Metileno
Más oxidado (ácido fórmico)	-CHO	Formilo
	-CHNH	Formimino
	-CH=	Metenilo

1.2 Metabolismo del folato y función bioquímica

Los folatos son co-factores y co-sustratos para la metilación biológica y la síntesis de ácidos nucleicos. Funcionan también como moléculas regulatorias y actúan en varias reacciones enzimáticas claves, transportando unidades activas de un átomo de carbono o monocarbonadas. Los folatos actúan, además, como sustratos para las reacciones donde ellos participan. Estas unidades monocarbonadas son necesarias para la síntesis de purinas y timidilato, siendo de esta manera, esencial para la síntesis, replicación y reparación del ácido desoxiribonucleico ADN (5).

Cinco transferencias de unidades de un carbono ocurren dentro de las células: el catabolismo de la histidina, la conversión de serina a glicina, la síntesis de timidilato, de purina y metionina. Estas reacciones ocurren a través de varias transferencias de electrones facilitadas por enzimas y coenzimas específicas tales como el flavín-adenín-nucleótido reducido (FADH₂) y nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH) (4).

1.2.1 Catabolismo de la histidina

El aminoácido histidina es convertido metabólicamente en ácido glutámico y requiere como coenzima al THF siguiendo la siguiente secuencia: histidina - ácido urocánico - ácido formimino-glutámico (FIGLU) - ácido glutámico. El THF acepta una unidad monocarbonada proveniente de la conversión de FIGLU a ácido glutámico. La transferencia del grupo FIGLU al THF y la remoción de un grupo amino (NH₂) por la enzima formimino-transferasa da lugar al 5,10-metilen-THF (9).

1.2.2 Interconversión de serina y glicina

La enzima serina-hidroximetil-transferasa (SHMT) cataliza la conversión del aminoácido serina a glicina utilizando como coenzima la vitamina B₆ (piridoxal-fosfato) y el THF. Esta es una reacción reversible que se desarrolla en la mitocondria de la mayoría de los tejidos (10). En cambio, el paso glicina a serina se desarrolla en el citoplasma de las células hepáticas y renales. La conversión de serina en glicina está acoplada a la transformación de THF a 5,10-metilen-THF, donde 2 carbonos que provienen de la glicina se transfieren a THF para formar 5,10-metilen-THF, liberando un metilo (CH₃-) (11). A su vez, 5,10-metilen-THF actúa como una activa coenzima para

incorporar unidades monocarbonadas al núcleo de las purinas y para convertir el uracilo a timina (12). Este 5,10-metilen-THF sirve como punto de entrada para una unidad monocarbonada en la vía del folato y es un sustrato clave en el metabolismo del folato, porque puede ser direccionado hacia la síntesis de timidatos y purinas o hacia la regeneración de metionina. La enzima metilen-THF-reductasa cataliza la conversión de 5-10 metilen-THF a 5 metil-THF utilizando como cofactor la flavín-adenín dinucleótido (FAD), una molécula de riboflavina (Vitamina B₂), formada por pirofosfato, ribosa y adenina (4).

1.2.3 Síntesis de timidato

El 5,10-metilen-THF dona un metilo para la metilación no reversible del 5-monofosfato-deoxiuridina (dUMP) a 5-monofosfato-deoxitimidina (dTMP, timidato), un precursor de la síntesis de ADN que es catalizada por la enzima timidato-sintetasa. Este timidato produce la oxidación de 5,10-metilen-THF a dihidrofolato inactivo que puede ser a su vez, convertido a THF por la enzima dihidrofolato-reductasa (DHFR). El THF y 5,10-metilen-THF pueden entrar también a la vía de la síntesis de purinas por la adición de un grupo formilo (3).

1.2.4 Síntesis de Purina

La síntesis de nucleótidos (purina y pirimidina) es una de las funciones más importantes del folato. Las bases de purinas se construyen sobre la ribosa mediante varias reacciones de amidotransferasa y transformilación. La síntesis de inosina-mono-fosfato (IMP) requiere de cinco moles de adenosín trifosfato (ATP), dos moles de glutamina, un mol de glicina, un mol de CO₂, un mol de aspartato y dos moles de formato. Las partes de formil son llevadas en el tetrahydrofolato (THF) en forma de 5,10-metilen-THF y 10-formil-THF. Para formar los anillos de purinas, el 10-formil-THF entrega una unidad monocarbonada al amino-imidazol-4-carboxamida ribonucleótido (AICAR) y a la glicinamida-ribonucleótido (GAR) por medio de las enzimas AICAR transformilasa y GAR transformilasa. En la síntesis de nucleótidos de pirimidina, el 5,10-metilen-THF metila a través de la enzima timidato-sintetasa el monofosfato-deoxiuridato (dUMP) para formar timidato monofosfato (TMP), quien a su vez limita la velocidad de síntesis para la elaboración del ADN(13).

1.2.5 Síntesis de metionina

En el ciclo de la metionina, 5-metil-THF transfiere un grupo metil a la homocisteína para sintetizar metionina, transformándose en THF. Este proceso es catalizado por la enzima metionina-sintetasa (MS), una enzima dependiente de vitamina B₁₂ (cobalamina). En el hígado y riñón la homocisteína puede ser convertida a metionina por la enzima betaína-homocisteína-metil-transferasa (BHMT) que cataliza la transferencia de uno de los grupos metilos de la betaína a la homocisteína. Se estima que un 30% de la remetilación de homocisteína en humanos ocurre a través de esta reacción (14). La vitamina B₁₂ consiste en un átomo central de cobalto (Co) rodeado por 4 anillos pirrólicos que forman un grupo macrocíclico casi plano (corrina) en torno al átomo de cobalto. En esta estructura, el cobalto posee 6 valencias de coordinación, 4 de las cuales establecen enlaces covalentes con los correspondientes nitrógenos (N) de los anillos pirrólicos (15). La quinta valencia de coordinación se halla siempre unida a un pseudo-nucleótido complejo, el 5,6-di-metil-bencimidazol, casi perpendicular al núcleo y una sexta valencia que puede unirse a diferentes radicales dando lugar a diversos derivados de la cobalamina (cianocobalamina, hidroxicobalamina, metilcobalamina, desoxiadenosilcobalamina). La hidroxicobalamina y la cianocobalamina (vitamina B₁₂) son formas no fisiológicas que son transformadas en el organismo, a formas fisiológicamente activas o coenzimas de vitamina B₁₂ (metil y 5'-desoxiadenosilcobalamina) (16).

La vitamina B₁₂ es liberada en el citoplasma de las células como hidroxicob(III)alamina siendo reducida a cob(I)alamina. Ésta es metilada a metilcob(III)alamina después de unirse a la enzima metionina-sintetasa. Alternativamente la vitamina B₁₂ puede ser transportada hacia la mitocondria y reducida, agregándose 5'-desoxiadenosil proveniente del ATP, en una reacción catalizada por desoxiadenosiltransferasa (17).

Como se mencionó anteriormente, la metil-cobalamina es el cofactor que participa en la remetilación de la homocisteína a través de la enzima metionina-sintetasa (MS). Esta enzima pertenece al grupo de las metaloproteínas y contienen tres dominios: uno catalítico para 5-metil-THF y homocisteína, otro al cual se une el cofactor de vitamina B₁₂ y un dominio para proteínas accesorias (18). La cob(I)alamina es metilada por 5-metil-THF generándose una enzima metionina-sintetasa ligada a metilcob(III)alamina,

que libera THF, transfiriendo el grupo metilo de la metilcob(III)alamina a la homocisteína para generar metionina. La escisión heterolítica de la unión cobalto-carbono permite la regeneración de la enzima ligada al cofactor cob(I)alamina. Este cofactor es ocasionalmente oxidado durante la catálisis a una forma no funcional cob(II)alamina. Para reactivar la enzima hay que reducir la cob(II)alamina a metilcob(III)alamina por medio de la enzima metionina sintetasa reductasa, una proteína de la familia de las proteínas P450-reductasa, quien utiliza para esta remetilación, S-adenosil-metionina (SAM) y nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato-reducido (NADPH) para obtener metilcob(III)alamina (19).

La cobalamina funciona como aceptor del grupo metilo del 5-metil-THF para formar metil-cobalamina que a su vez dona el grupo para metilación de la metionina. De esta forma, se asegura la provisión de S-adenosil-metionina (SAM), el dador primario de un grupo metilo para muchas reacciones biológicas de metilación que incluyen al ADN. SAM es hidrolizada a homocisteína y adenosín y convertida en S-adenosil-homocisteína (SAH) por la enzima S-adenosín-cisteína-hidroxilasa (SACH), para recomenzar nuevamente un nuevo ciclo de re-metilación. La inhibición de las reacciones de transmetilación dependientes de la S-adenosil-metionina se produce por la conversión metabólica de S-adenosil-homocisteína (SAH) en adenosina y L-homocisteína mediante una reacción reversible, catalizada por la enzima S-adenosil-homocisteína-hidrolasa (SAHH) (20).

La homocisteína se transforma en cisteína por medio de dos reacciones dependientes de piridoxal-fosfato, un derivado de la vitamina B₆ o piridoxina. En la primera etapa sufre un proceso de transulfuración catalizado por la enzima cistationa B-sintetasa. En este paso, la molécula de cisteína se condensa con una molécula de serina para formar cistationina (21). Es en este punto que la homocisteína no podrá volver a ser utilizada como precursor para la síntesis de metionina. En la segunda reacción, la cistationina es transformada a cisteína por acción de la cistationina-β-liasa. La cisteína es precursora del glutatión y la taurina, compuestos de gran importancia metabólica como antioxidantes (glutatión) y neurotransmisor (taurina) (22).

Al parecer, el metabolismo del folato es regulado de tal modo, que la síntesis de adenosil-metionina (SAM) es prioritaria sobre la síntesis de timidilatos, probablemente

porque la disponibilidad de los grupos metilos es limitada, ya sea por deficiencia de folato o metionina. Entonces el flujo de unidades monocarbonadas se dirigiría entre las vías dependientes de folato, de modo tal, que el folato como cofactor sería usado fundamentalmente en el ciclo de la metionina para poder proteger las reacciones de metilación y así suprimir la síntesis de ADN. También las coenzimas del folato serían preferentemente dirigidas hacia las reacciones de metilación dependiente de SAM cuando el folato celular se encuentra en bajas concentraciones, donde la enzima metil-tetrahidrofolato-reductasa (MTHFR) sería insensible a los cambios en la disponibilidad de la 5,10-metilen-THF y donde la actividad de la timidato sintetasa sería altamente dependiente de ellas, existiendo entonces una competencia de estas dos enzimas por una reserva celular común de 5-10 metilen-THF (3, 22).

3.3 Compartimentalización del folato

Se ha reconocido recientemente que el metabolismo de unidades monocarbonadas mediadas por folatos en las células se encuentran compartimentalizadas. La mitad de los folatos celulares se encuentran ubicados en la mitocondria y en el citoplasma, aunque también se observan folatos en el núcleo y en otros organelos celulares que no influenciarían en forma importante la cantidad celular total de folato (10).

Como se ha mencionado en puntos anteriores, el metabolismo de los componentes monocarbonados en el citoplasma es requerido para la síntesis de purinas y timidato y la remetilación de homocisteína a metionina. Las fuentes de unidades monocarbonadas en el citoplasma incluyen formato, serina, histidina y purinas (23). Al parecer, el intercambio de folatos libre entre el citoplasma y la mitocondria sería limitado, observándose que alrededor de un 40% de los folatos de la mitocondria se encuentra como una fuente estable de poliglutamatos que no se intercambia con el compartimento citoplasmático (24).

El citoplasma y la mitocondria difieren además en la distribución de formas específicas de cofactores de folato, así como, en la extensión de la poliglutamilación de estos componentes. Se ha observado en animales de investigación, que en el citoplasma los principales cofactores encontrados serían el THF, 5-metil-THF, 10-formil-THF y 5-formil-THF. En la mitocondria se ha observado que los factores predominantes serían el 10 formil-THF y THF (25).

Estudios muestran la existencia de un transportador de folatos reducido en la membrana de la mitocondria, sin embargo, el transporte de unidades monocarbonadas pareciera no suplir todas las necesidades de estos compuestos al interior de ella, los que serían suplidos por medio de la transferencia de donadores de unidades monocarbonadas (25). El folato sería transportado a la mitocondria como monoglutamato y por acción de la enzima folil-poliglutamato-sintetasa mitocondrial sería convertido en poliglutamato. La mitocondria es, a su vez, la fuente primaria de unidades monocarbonadas para el metabolismo citoplasmático, para lo cual se requiere folato en la forma de formato, así como también para la síntesis de metionil-ARN-formilado, del catabolismo de la colina, purinas e histidinas y para la interconversión de serina a glicina (26,27).

Según algunos autores, alrededor del 10% del folato celular se encontraría en el núcleo (28). Se ha observado además, que la síntesis de folato mediada por la enzima timidilato-sintetasa (TS) ocurriría tanto en el citoplasma como en el núcleo. Esta enzima, junto a la serina-hidroxi-metiltransferasa (SHMT) han sido encontradas en el núcleo de algunas células de numerosos mamíferos y permitirían la síntesis *de novo* de timidilato durante la replicación celular impidiendo la incorporación de uracilo (29).

1.4 Absorción, transporte y catabolismo de los folatos

1.4.1 Absorción

La biodisponibilidad de los folatos en los seres humanos depende de la capacidad del huésped de hidrolizar los folatos naturales (poliglutamatos), debido a la incapacidad de cruzar la membrana celular cuando poseen más de tres cadenas de glutamatos (30). La hidrolización de las cadenas de poliglutamatos a monoglutamatos ocurre en el intestino delgado por acción de la enzima folil-poliglutamato-carboxipeptidasa II (GCP II). Ésta se ubica en la parte apical de las microvellosidades intestinales.

Luego de este proceso los folatos son absorbidos a través del intestino delgado, en el duodeno y en la parte superior del yeyuno por varios tipos de transportadores que se expresan en la membrana apical del enterocito (31). El transportador de folato reducido, se expresa principalmente en la parte distal del intestino delgado, funciona a pH neutro y es un anión intercambiador que media la entrega de folato en diferentes tipos de células y presenta una mayor afinidad por los folatos reducidos, incluyendo el 5-metil-tetrahidrofolato (5-metil-THF). Por otra parte, el transportador de folato acoplado a protones se expresa principalmente en el duodeno y opera en forma óptima a pH bajo (32). En este tipo, la absorción ocurre a través de receptores que se encuentran anclados en las membranas celulares a través de un componente glicolipídico, el glicosil-fosatidil-inositol (GPI). Éste internaliza los folatos a la célula a través de un proceso de endocitosis y tiene una alta afinidad por el ácido fólico y una menor, pero igual alta afinidad, por el 5-metil-THF (31). Otro mecanismo de transporte celular de folato es la difusión pasiva que se ha documentado sólo como efecto farmacológico; es decir, no se satura cuando la ingesta de folato es fisiológico (33). Estudios desarrollados con dosis orales de ácido fólico entre 260-280 µg/día han reportado la aparición de ácido fólico sin metabolizar en la circulación (34). Una vez absorbidos, los folatos son reducidos y

metilados en el enterocito para luego ser transportados a las células (31).

1.4.2 Transporte

Los folatos sólo circulan en la sangre en forma de monoglutamatos y son la única forma en que son transportados a través de la membrana celular (31). Los altos niveles de folatos observados en los enterocitos facilitarían su salida a través de la membrana basolateral, probablemente a través de una proteína miembro de las denominadas proteínas asociadas a resistencia de multidrogas, entrando de esta manera al sistema vascular (35). Entran a la circulación portal a través de las venas mesentéricas y son depositados en el hígado, un órgano central en la homeostasis del folato, a través de un transporte de folato transvesicular con gradiente de pH. Los folatos que entran al hígado pueden ser depositados en forma de poliglutamatos, otra pequeña parte entra a la bilis y de esta manera al duodeno y yeyuno, siendo subsecuentemente reabsorbidos, entrando de esta forma al ciclo de recirculación enterohepática (33).

Al interior de las células son nuevamente convertidos en poliglutamatos por la enzima folil-poliglutamato-sintetasa (FPGS) a través de una unión peptídica γ -carboxilada. Esta enzima se encuentra presente en numerosos tejidos y se localiza primariamente en los lisosomas siendo el hígado el sitio de mayor actividad, siendo necesaria para la acumulación de folatos en la mitocondria, los que deben contener al menos tres glutamatos para poder permanecer atrapados al interior de la célula (3). El contenido de folatos en el citoplasma y mitocondria no se encuentran en equilibrio (36). Los poliglutamatos del citoplasma no son transportados a la mitocondria, sin embargo, los contenidos en ella pueden efluir hacia él sin previa hidrólisis. Los poliglutamatos intracelulares son mejores sustratos que las formas monoglutámicas para la enzimas intracelulares dependiente de folato. La retención de folatos es influenciada por la acción de la enzima γ -glutamil-hidrolasa (GGH) que cataliza la remoción de los poliglutamatos de los folatos intracelulares, generando folatos monoglutámicos que pueden salir desde el interior de la célula (12). Esta enzima se encuentra presente también en el plasma, de tal modo, que si algún folil-poliglutamato es liberado en el plasma puede ser hidrolizado a la forma circulante habitual de monoglutamatos (4).

1.4.2.1 Transporte en el riñón

Los folatos sanguíneos que están unidos a proteínas son filtrados en el riñón. Éstos son eficientemente reabsorbidos y no se encuentran presente en la orina con niveles fisiológicos de ingesta. Los folatos son acumulados en forma importante en el riñón uniéndose al receptor de folato-alfa (37). En el túbulo proximal renal se reabsorbe 5-metil-THF a través de receptores que operan a través de endocitosis y que contribuyen a una mayor disponibilidad de folatos. Estos son entregados posteriormente, en forma sistémica, a todos los tejidos a través del plasma (38).

1.4.2.2 Transporte en el cerebro

A nivel cerebral se observa la presencia de transportadores de folatos reducidos ubicados a la barrera hemato-encefálica, así como también, la expresión de transportadores de folatos acoplados a protones (31). Su transporte en los capilares cerebrales es saturable y puede ser inhibido por bajos niveles de 5-metil-THF o por ácido fólico (39). La relación de folatos presentes en el líquido cerebroespinal versus lo observado en sangre es de alrededor de 2:1 y 3:1 (40). Esto es consistente con la presencia de transportadores de folatos presentes en el plexo coroideo del tipo acoplado a protones y de receptores de folato-alfa que operan mediados por endocitosis. Al igual que el transporte de folatos a través de la barrera hematoencefálica, el 5-metil-THF parece ser el sustrato preferido para ser transportado a través del plexo coroideo y para ser utilizado por las células cerebrales (39).

1.4.2.3 Transporte en el eritrocito

El folato se incorpora en el eritrocito durante la eritropoyesis que ocurre en la médula ósea (4). La evidencia muestra que los folatos nativos de los eritrocitos existen en formas más oxidadas de folato como el formil-THF, pero también como 5-metil-THF. Se estima que la mayor parte del folato eritrocitario se encuentra en forma de folil-poliglutamato, siendo las formas predominantes los penta y hexaglutamatos (4). Sin embargo, considerando la variación en los métodos de extracción de folatos, la existencia de una importante interconversión de los mismos, su gran labilidad y las numerosas formas de folatos existentes, se observa que los resultados presentados, en

relación a las formas de folatos, varían en forma importante (41,42). Se estima que la concentración de folatos en el glóbulo rojo es cercana a los 140-150 ng/ml. Su función pareciera ser más bien de depósito y como tampón para mantener la homeostasis de folato. El folato eritrocitario se utiliza como una medida de estado del folato y a diferencia del plasma no es afectada por la dieta reciente (43). Los folatos senescentes de los eritrocitos son salvados por el sistema retículo endotelial y transportados al hígado. Estos aparecen después en la bilis para luego ser reabsorbidos y redistribuidos en tejidos periféricos.

1.4.3.4 Transporte en el embarazo

Durante el embarazo los requerimientos de folato son elevados observándose que el nivel en el cordón del feto se mantiene alto, aún cuando el nivel de folatos en la madre sea bajo (44,45). El transporte de folatos a través de la placenta es mediado por receptores placentarios de folatos (receptores de folato-alfa) que se ubican en las microvellosidades de membrana del sincicio-trofoblasto. Estos son internalizados a través de receptores mediados por endocitosis. También operan otros transportadores tales como el transportador de folato reducido y el acoplado a protones (46). Esto se traduce en una alta concentración de folatos sanguíneo dentro de la placenta que son transportados al feto por difusión pasiva y por el transportador reducido de folato, asegurando de esta manera, el adecuado un desarrollo del feto (47).

1.4.3 Catabolismo y excreción de folatos

El catabolismo del folato es un importante componente de la regulación intracelular de folato y del contenido total de folato a nivel corporal. Los folatos intracelulares se encuentran unidos a enzimas dependientes del folato o a proteínas que permiten estabilizar su cantidad al interior de la célula. De esta manera, son más estables que los folatos libres al estar protegidos de la degradación celular oxidativa y de la oxidación mediada por enzimas (12). El recambio de folatos de la célula puede ocurrir por tres mecanismos: los monoglutamatos escapan de ser convertidos a poliglutamatos dentro de la célula o son hidrolizados en sus uniones peptídicas por la enzima GGH y convertidos en monoglutamatos o bien son catabolizados a productos inactivos (12). Nuevos estudios demuestran que la enzima metenil-THF-sintetasa que cataliza a nivel

citoplasmático la formación de 5,10-metilen-THF a partir de 5-formil-THF, regularía la concentración intracelular de folato, acelerando el catabolismo de los monoglutamatos que entran a la célula o que no están ligados a proteínas. El recambio de folatos ocurriría a diferentes velocidades dependiendo del tejido, siendo más lento en el tejido cerebral (35). Al parecer el aumento de la expresión de la MTHFR disminuiría la concentración de 5-metil-THF y 5-formil-THF dos de las formas más estables de folato y elevaría los niveles de 10-formil-THF y THF, cofactores más sensibles a la degradación oxidativa no enzimática (48). Al parecer la poliglutamilación y degradación de folatos son procesos competitivos donde el catabolismo sería más determinante que el transporte de folatos en la regulación de la concentración celular de folatos.

Estudios recientes muestran que la cadena pesada de la ferritina acelera el catabolismo del folato y su mayor expresión puede contribuir a la depleción de la concentración celular de folato independiente del nivel exógeno de folatos (12). El aumento del catabolismo del folato puede llevar a una deficiencia cuando las dietas son inadecuadas, en el embarazo por mayores requerimientos o en pacientes con patologías como cáncer y mala absorción intestinal debido al aumento de la excreción de folato intacto (49).

Investigaciones han confirmado que la principal ruta de recambio de folato es por vía del catabolismo y escisión en la zona del enlace C9-N10 entre las pteridinas y el para-aminobenzoil-glutamato (pABG). Este último es acetilado en el citoplasma por la arilamina-N-acetil-transferasa a acetamido-benzoil-glutamato siendo posteriormente excretado por la orina. Se ha observado que la excreción de catabolitos estaría significativamente reducida cuando existe una dieta baja en folato, sugiriendo que en situaciones de déficit existiría una reducción del catabolismo o del recambio de folato (50, 51). Se estima que cerca de 0,3 a 0,8% de la reserva de folatos se excreta diariamente en la forma de catabolitos (52).

Se ha observado también, que la excreción renal de folatos es de alrededor de un 5% después de entregar dosis fisiológicas, que se incrementa cuando la dosis es mayor. En las heces, la excreción alcanza a valores cercanos a 415 nmol/día, derivado de la producción bacteriana, de la lisis de eritrocitos y de las secreciones gastrointestinales

(53). Aún cuando es difícil conocer qué porcentaje de la dieta es excretado por deposiciones, se estima que alrededor de 20% del folato fecal correspondería a folato de la dieta no absorbido (53, 54).

1.5 Fuentes dietarias de folatos

Los folatos se encuentran presentes en una gran variedad de alimentos siendo las fuentes más importantes el hígado, la levadura y los vegetales de hoja verde (6). Los folatos contenidos naturalmente en los alimentos son extremadamente sensibles al calor. Éstos se pierden en forma importante durante la cocción debido al traspaso al agua de cocción y a su degradación por el calor. También se pierden por efecto de la oxidación y la exposición a la luz ultravioleta (55).

El contenido de folato varía dependiendo de las características genéticas de las plantas y de factores externos como las zonas de cultivos (56). Otro factor a considerar en el contenido de folatos en los alimentos es la alimentación recibida por los animales, cuyas carnes se utilizan para consumo humano. Se ha observado, por ejemplo, que el hígado muestra un contenido de folato variable, que depende de la alimentación que el animal ingiere y la edad en la cual es sacrificado (57).

También se observa una gran variación en el contenido de folatos cuando se comparan diferentes tablas de composición de alimentos. Estas variaciones pueden ser explicadas por diferencias en los métodos de análisis y en los procedimientos utilizados para su extracción. Aún cuando la Asociación Americana de Química Clínica (AACC) recomienda utilizar el método trienzimático para la extracción de folatos, se observa en numerosas publicaciones científicas la utilización de otros métodos, incluyendo la determinación por cálculos indirectos (58). El tipo de antioxidantes usados, así como, los procedimientos de desconjugación y el pH de los ensayos también influyen en las variaciones observadas (59).

Para determinar folatos en alimentos se utilizan diferentes métodos siendo el método microbiológico uno de los más utilizados. Se basa en el crecimiento de un microorganismo, generalmente el *Lactobacillus rhamnosis* variedad Casei, que responde a las formas monoglutámicas, diglutámicas y triglutámicas. Sin embargo, algunos factores presentes en el alimento pueden interferir en el crecimiento del

Lactobacillus generando imprecisiones en la determinación de folatos totales (60). Se han desarrollado otros métodos como el cromatográfico de alta resolución (HPLC) que permite diferenciar y cuantificar las distintas formas derivadas tras una extracción previa de la matriz del alimento y la posterior deconjugación por incubación con la enzima conjugasa (61). La cromatografía combinada de Líquidos-Masas (LC-MS) permite tener una mayor certeza de la especie química de los folatos que se determina. Existen otros ensayos como los basados en proteínas fijadoras de folatos, radioproteínas fijadoras (*Radio Protein Binding Assay* o RPBA) y con enzimas proteicas enlazadoras (*Enzymatic Protein Binding Assay* o EPBA) que han permitido mejorar la determinación de folatos en alimentos (62).

2. Efectos en salud de los folatos

2.1 Defectos del tubo neural

Los defectos del tubo neural (DTN) son una de las malformaciones congénitas más frecuentes del recién nacido y representan un importante problema de salud pública por su alta morbilidad, mortalidad y coste social (63). Estos se producen a partir de la perturbación del desarrollo neuronal normal y se presentan en formas abiertas o cerradas en cualquier lugar a lo largo del eje craneal y a menudo son el resultado de una compleja interacción entre factores ambientales y genéticos.

El rol de la nutrición en la etiología de los defectos del tubo neural fue descrita en los años 60 por Hibbard and Smithells, quienes sugirieron una posible asociación entre deficiencia de folatos y DTN (64,65). La primera descripción de la asociación entre la deficiencia de folato y DTN fue efectuada por Smithells et al., quienes mostraron el efecto protector del ácido fólico en la recurrencia de los DTN (66). Otro estudio randomizado publicado el mismo año también mostró un efecto preventivo en la recurrencia de DTN cuando las embarazadas recibían 5 mg/día de ácido fólico (67).

Un riguroso ensayo randomizado y controlado doble ciego desarrollado por el Consejo de Investigación Médica del Reino Unido mostró que la suplementación de 4 mg/día de ácido fólico a mujeres con antecedentes de niños con DTN resultaba en una reducción de 72% en las recurrencias (68).

Otros estudios caso-control también contribuyeron a demostrar que las madres suplementadas con ácido fólico o con dieta altas en folato dietarios presentaban un menor riesgo de tener hijos con DTN. Aún cuando las conclusiones de estos últimos estudios fueron productos de una evaluación retrospectiva del consumo de folatos dietarios y de ácido fólico, sus resultados permitieron observar la existencia de una relación casi linear de la distribución de DTN en relación a un consumo entre 100 a 400 μ g/día de ácido fólico (69,70).

Por otra parte, Czeizel et al. (71) suplementaron a un grupo de mujeres con una combinación de ácido fólico y otras vitaminas demostrando un efecto preventivo para el primer episodio de DTN, un hallazgo considerado importante dado que 95% del total de DTN ocurren en el primer embarazo. Se agrega a la evidencia protectora del ácido fólico en la prevención de los DTN, un estudio desarrollado en mujeres medicadas con carbamazepina o trimetropin, dos medicamentos que antagonizan el efecto del folato, que mostraban los beneficios del ácido fólico al reducir la incidencia de estas malformaciones (72).

Los resultados provenientes de estos estudios permitieron al Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos en el año 1992, recomendar a todas las mujeres que planeaban un embarazo, una ingesta de ácido fólico de 0.4 mg/día un mes antes de la concepción y durante el primer trimestre del embarazo. Cuando existían antecedentes de DTN en el embarazo previo, se recomendó 4 mg/día de ácido fólico durante todo el período concepcional (73). Estas recomendaciones sirvieron como base para la fortificación obligatoria de la harina de trigo en numerosos países como Estados Unidos, Canadá, así como también, en Chile (74).

El cierre del tubo neural ocurre alrededor de la tercera a cuarta semana de gestación, dando origen al sistema nervioso central y a los nervios periféricos, etapa en que muchas mujeres no saben que están embarazadas. Se ha sugerido diferentes mecanismos para que el ácido fólico tenga un efecto beneficioso en la prevención de los DTN, sin embargo, éstos no están claramente establecidos (63).

Al parecer, la deficiencia de folato sería un factor de riesgo para los DTN, pero sólo en presencia de un genotipo que lo predisponga. Se estima que una parte de los casos de DTN (0.7 a 0.8/1000 embarazos) persistirían independientemente del uso de ácido

fólico y que un aumento en la dosis no los beneficiaría (75). Esta observación ha sido establecida también en algunos de modelos genéticos específicos de ratón que no muestran beneficios con su aporte (76).

Se ha propuesto que un aumento del consumo de ácido fólico podría prevenir DTN eliminando los embriones afectados con malformaciones (teratonasia) que explicaría la desaparición de una parte de los casos con DTN debido a la pérdida temprana del embarazo (77). Esta hipótesis podría estar relacionada con los resultados de un estudio húngaro aleatorizado, donde se observó un pequeño aumento de abortos involuntarios en la mujeres que recibían como tratamiento un multivitamínico (71). Por otra parte, se ha descrito, en diferentes modelos de ratones, que la suplementación con ácidofólico en la dieta produce una amplia gama de respuestas, que van desde la reducción de malformaciones, hasta un aumento aparente de casos con DTN, las que varían en las distintas cepas de ratones y en relación a la dosis consumida (78).

De los factores genéticos y no genéticos implicados en la causas de los defectos del tubo neural se ha establecido que un 70% puede ser atribuido a una causa genética. Como apoyo a esta afirmación se describe un mayor riesgo de recurrencia de los hermanos del caso índice (2.5%) en relación a riesgo de población general (0.1%) y una disminución gradual de la frecuencia en parientes más lejanos (79). También se reportan algunas asociaciones positivas entre algunas variantes genéticas y defectos del tubo neural en varios estudios de caso-control. Dentro de ellos, el polimorfismo del gen de la enzima MTHFR (677CT) se ha asociado con un riesgo 1.8 veces mayor para fetos con DTN, aunque la mayor predisposición se observa en poblaciones no hispanas (80).

Como causa de los DTN se han implicado, además, a algunos genes que codifican las enzimas que catalizan el metabolismo de un carbono en la mitocondria. Dentro de ellos, el polimorfismo intrónico del gen MTHFD1L para la enzima mitocondrial 10-formil-THF sintetasa se ha asociado con un riesgo aumentado de DTN (81). Se ha observado además, en algunas cepas de ratones, que cuando se altera el sistema que divide la glicina, un componente multi-enzimático del metabolismo del ácido fólico mitocondrial, se producen cambios que podrían ser determinantes en el desarrollo de los DTN (82). También variantes de los genes (AMT y GLDC) que codifican para las enzimas aminometiltransferasa y glicina-deshidroxilasa, generan mutaciones que determinan un

cambio del sentido en el flujo de formato desde la mitocondria al citoplasma. Estos hallazgos son consistentes con estudios en líneas celulares provenientes de fetos con DTN que muestran errores en el metabolismo del folato con una disminución de la síntesis de timidilato (83), destacando la importancia de una adecuada función del metabolismo del ácido fólico mitocondrial en el cierre del tubo neural (84).

Algunos temas de investigación en animales de experimentación podrían entregar en el futuro, herramientas para comprender mejor la relación en ácido fólico y DTN. Por ejemplo, se ha observado que algunos módulos genéticos discretos (agrupación de genes con una función común), determinan el cierre en ciertas regiones específicas del sistema nervioso central. Su disrupción determinaría DTN en zonas específicas de la línea de cierre del tubo neural, como por ejemplo, exencefalia en la zona apical o espina bífida en la región caudal. En el futuro, la identificación más específica de algunos módulos genéticos puede facilitar el estudio de cómo los determinantes genéticos se relacionan con los riesgos para desarrollar DTN (85).

La función ciliar celular, un módulo genético que está bien definido, ha surgido como un mecanismo regulador crítico de los DTN. Los cilios corresponden a pequeñas protuberancias celulares o microtúbulos que son esenciales para la señalización de célula a célula (86). La mutación de los genes asociados a los cilios se relaciona con alteraciones en el cierre apical en el feto que provocaría específicamente exencefalia (87). Estudios en seres humanos han mostrado la relación que existiría entre algunas enfermedades y la alteración de los cilios y su relación con el desarrollo de DTN (88). Entre ellos, destaca un número de genes que se asocian con el síndrome de Meckel-Gruber donde se observa el desarrollo de encefalocele occipital y que es conocido por su compromiso en la formación de cilios (89).

Otro mecanismo recientemente descrito que estaría implicado en el desarrollo de los DTN es la polaridad celular plana (PCP). Ésta corresponde a una vía de señalización para desarrollar la morfogénesis de manera coordinada, permitiendo la orientación necesaria para numerosos procesos de desarrollo, incluyendo los movimientos direccionales durante la gastrulación y neurulación de los vertebrados (90,91). Estos defectos en las vías de señalización de la PCP han sido asociados con el desarrollo de DTN en modelos animales y en cohortes de seres humanos (92).

Considerando que la metilación del ADN es reprogramada durante las primeras etapas de la embriogénesis, siendo parte del código epigenético y a su vez reguladora de la expresión genética, se estima que este mecanismo también podría estar asociado con el desarrollo de los DTN. Se ha descrito, una acción del ácido fólico en la regulación epigenética de los genes de expresión a través de la metilación del ADN y de las histonas del genoma que cumplirían una función en la prevención de los DTN, observándose que los cambios en los niveles de S-adenosil-metionina (SAM) podrían afectar la metilación del ADN y la modificación de las histonas, pudiendo influir de esta manera en la transcripción genética (93). La participación del ácido fólico en la síntesis de purinas y pirimidinas del ADN, así como su efecto en la metilación de macromoléculas, tendría una enorme importancia en la proliferación celular, cumpliendo de este modo, una función importante en el cierre del tubo neural.

También se ha observado que las mutaciones que afectan la metilación del ADN por modificación de las histonas, en especial por acetilación o remodelación de la cromatina, pueden resultar en DTN en algunos modelos de ratones. Este efecto se describe en seres humanos con el consumo de ácido valproico, un medicamento antiepiléptico que inhibe la enzima deacetilasa y que es un conocido factor de riesgo para DTN en humanos en etapas tempranas del embarazo (94). Esto alteraría el equilibrio en la acetilación de las proteínas, de manera similar a la acción del inhibidor de histona de acetilasa tricostatina-A que provoca defectos del tubo neural en ratones (95).

Al parecer, la participación del ácido fólico en el metabolismo de un carbono pareciera ser una de las claves en la prevención de los DTN. Éste interactuaría con mecanismos genéticos y factores ambientales que precisan ser determinados con mayor claridad para comprender de una mejor forma el desarrollo de este tipo de malformaciones congénitas.

2.2 Anemia

La deficiencia de folato se produce principalmente por una dieta con bajo aporte de folato, así como también, se encuentra presente en síndromes de mala absorción, alcoholismo e interacción con algunos medicamentos (96).

El síntoma clásico e la deficiencia de folato es la anemia macrocítica que representa un trastorno en la maduración de los precursores eritroides y mieloides. Esto lleva a la formación de células con una apariencia morfológica que se caracteriza por un aumento en la masa y maduración del citoplasma en relación al núcleo, que refleja una síntesis alterada del ADN en las células eritropoyéticas que puede llegar a ser hasta el doble en relación a una célula normal. Se puede observar, además, un porcentaje de ADN con un aspecto parcialmente fragmentado. En la médula ósea se encuentra que muchas células están detenidas en la fase G2, justo antes de la mitosis y que, cuando se dividen, sufren de apoptosis (15, 97).

La alteración en la síntesis de ADN en el déficit de folato se ha atribuido a una síntesis defectuosa de timidilato con un aumento en la incorporación errónea de uracilo en el ADN. La eliminación de uracilo por la enzima de reparación uracilo-ADN-glicosilasa, así como la disminución de reparación de los vacíos producidos por esta enzima, daría lugar a un aumento de roturas del ADN de doble cadena (98).

En individuos con dietas deficientes de folato, se puede detectar una disminución del folato sérico en sólo tres semanas. La disminución de las reservas provoca, en orden de aparición, la hipersegmentación de los neutrófilos, el aumento de tamaño de los eritrocitos, la aparición de cambios megaloblásticos en médula ósea y finalmente después de cuatro meses y medio, aparece la anemia. La anemia megaloblástica puede ser causada también, por deficiencia de vitamina B₁₂. Después del descubrimiento del ácido fólico, se observó que la suplementación de esta vitamina producía una mejoría de la anemia pero también un "enmascaramiento" del déficit de vitamina B₁₂, permitiendo un avance del trastorno neurológico asociado a su carencia, específicamente de la degeneración subaguda combinada de la médula (99).

La suplementación de ácido fólico en algunos pacientes con déficit de vitamina B₁₂ se ha asociado con importante recaídas neurológicas y hematológicas, aunque muchas veces en forma disociada, sugiriendo que tanto la sangre como el sistema nervioso podrían mostrar mejorías y recaídas, en diferentes grados y velocidad que reflejaría las profundas diferencias en la estructura, función y renovación celular de ambos tejidos (100).

2.3 Alteraciones neurológicas

El ácido fólico, la forma sintética del folato fue desarrollada en el año 1945, siendo utilizada ampliamente a partir de esa fecha en el tratamiento de la anemia perniciosa. La suplementación fue seguida en los mismos pacientes, por un aumento en las complicaciones neurológicas, que pudieron posteriormente ser revertidas cuando la vitamina B₁₂ fue aislada e incorporada en el tratamiento (100).

Por ello, la mayor preocupación en relación a un mayor aporte de ácido fólico se describe en relación al enmascaramiento de la deficiencia de vitamina B₁₂ que pueda impedir un diagnóstico oportuno de la neuropatía asociada a la deficiencia de esta vitamina, conocida como degeneración subaguda de la médula espinal. La presentación clásica se acompaña de una aparición simétrica de parestesias en pies y manos que lleva a una ataxia de la marcha. El sitio dominante suelen ser los pies, pero también las manos y el área pélvica puede verse afectada inicialmente. La debilidad muscular y parálisis son signos tardíos y suelen ser irreversibles. Otros síntomas más infrecuentes son la disminución de la visión, la impotencia y la incontinencia urinaria y fecal. Se describe que cuando el ácido fólico es suplementado en personas con deficiencia de vitamina B₁₂ se mejora la anemia, pero no se previene el daño en el cerebro, médula espinal y en los nervios periféricos, sino que éstos, incluso pueden agravarse. Muchas veces los signos neurológicos suelen ser la primera manifestación del déficit, aún cuando la anemia no es evidente (101).

Teóricamente esto puede suceder porque el exceso de ácido fólico provocaría un bloqueo metabólico de la síntesis de ácidos nucleicos en personas con déficit de vitamina B₁₂, permitiendo que la división celular continuara en la médula y enmascarara la anemia. Esto llevaría a un aumento en la demanda de grupos metilos por las células en desarrollo y una depleción de la metilación potencial, en especial, en las células que no se dividen en el sistema nervioso. El grupo de población con mayor riesgo serían los adultos mayores, por su mayor prevalencia de déficit de vitamina B₁₂ y en quienes se observan mayores fallos cognitivos (102).

Los folatos cumplen también una importante función en el crecimiento, diferenciación, desarrollo, y reparación cerebral, así como también, en la cognición, el ánimo y envejecimiento. La deficiencia severa y prolongada de folatos y vitamina B₁₂ se

relaciona con un aumento de la homocisteína y con una menor síntesis de metionina, donde ambas vitaminas cumplen un rol como cofactor dependiente de la enzima metionina-sintetasa (103). Existe evidencia de que altos niveles de homocisteína pueden inducir daño en el sistema nervioso central determinando deterioro cognitivo, demencia y enfermedad de Alzheimer. Los mecanismos que explicarían este daño podrían estar dados por una falla en el metabolismo del glutatión y un aumento del estrés oxidativo que determinaría una injuria neuronal y que limitaría la reducción de vitaminas al interior de la neurona a una forma metabólicamente activa (104,105). Su déficit también se asocia a fallas en la metilación del ADN que podrían incrementar la síntesis del péptido beta amiloide determinante de la enfermedad de Alzheimer (106).

Numerosos estudios muestran que bajos niveles de folatos se asociarían a menores capacidades cognitivas como fallos en la memoria, disminución de la orientación, de la abstracción y de la capacidad de resolver problemas (107). Un bajo aporte de estas vitaminas determina una falla en la síntesis, transcripción e integridad del ADN generado por una menor producción de purinas, especialmente de timidina y por un aumento en los niveles de homocisteína. Estas alteraciones determinan una menor donación de metilos y una menor metilación del ADN, importante no sólo para la expresión genética, sino que para otros mecanismos epigenéticos que pueden contribuir a la desmielinización y al recambio de monoaminas implicadas en la depresión (108). Estudios en animales muestran que un aporte adecuado de ácido fólico determinaría un crecimiento de los axones sensoriales del cordón espinal de ratas contusas sugiriendo que un adecuado aporte podría contribuir a la reparación del sistema nervioso de los adultos (109).

Por otra parte nuevos hallazgos sugieren que altos niveles de folatos por sí mismos podrían determinar fallas en la función normal, no sólo de las células nerviosas, sino que también en las células proliferativas (110-112). Uno de los mecanismos sugeridos sería que altas concentraciones de folatos actuarían como un antagonista después de la primera etapa de conversión del folato, permitiendo la acumulación de dihidrofolato, una forma de poliglutamato que inhibe la enzima timidina-sintetasa y la formación de timidilato necesario para la síntesis de ADN. Además se inhibirían otras enzimas requeridas para la formación de purinas, determinando un efecto dual, ya sea facilitando o inhibiendo la síntesis de ADN. El dihidrofolato formado inhibiría también la enzima

metilen-tetrahidro-folato-reductasa (MTHFR) y la formación de 5-metil-tetrahidrofolato (5-MTHF) produciendo una disminución de la síntesis de metionina, que podría explicar también los efectos observados en la parte cognitiva (113).

Otros autores hipotetizan que los folatos sintéticos, ácido fólico, y algunos metabolitos sirven como aceptor de electrones(oxidantes) durante su metabolismo que puede exacerbar el déficit de vitamina B₁₂ por la oxidación intracelular de una manera semejante a lo observado en la exposición de esta vitamina a óxido nítrico (114). Esto determinaría un fallo primario de la enzima metionina sintetasa que cataliza la conversión de homocisteína a metionina utilizando el metil-tetrahidrofolato como donador de metilos generando una menor disponibilidad de vitamina B₁₂ como cofactor para reacciones mitocondriales. De esta forma, se comprometerían algunas reacciones asociadas que aumentarían la deficiencia de vitamina B₁₂, los niveles de homocisteína y de ácido metil malónico (AMM) con las respectivas consecuencias hematológicas y neurológicas (115).

Los altos niveles de homocisteína observados en muchos estudios en relación a bajos niveles de vitamina B₁₂ y niveles elevados de folatos séricos, reflejarían entonces la alteración en la actividad de la enzima metionina sintetasa. Se ha observado que este efecto es más evidente en la población evaluada después de la fortificación de harinas quienes presentan niveles folatos séricos muy elevados (>59 nmol/L) y donde cerca del 80% del folato ingerido correspondería a ácido fólico (116).

2.4 Cáncer

Numerosos estudios han descrito el rol benéfico del folato en la etiología del cáncer. Al parecer el 5-metil-THF es un cofactor crítico en la síntesis de novo de SAM, el principal donador de metilos para muchas reacciones de metilación. Se ha descrito que la metilación de las islas citosina-guanina (CpG) en la región promotora regula la expresión genética (117), silenciando la transcripción en la carcinogénesis y determinando que los genes afectados pierdan su función (118). La hipometilación genómica del ADN ocurre tempranamente en todos los cánceres y preceden a las anomalías cromosómicas y mutacionales (119). Esto altera la estructura de la cromatina aumentando el número de mutaciones que contribuyen a la iniciación o

progresión de la transformación celular (120). La densidad de la metilación influye además en la expresión genética, siendo los genes supresores de tumores especialmente sensibles al silenciamiento de la metilación durante la progresión de los tumores (121).

Un déficit de folato, especialmente de la coenzima 5,10-metilen-THF facilita la introducción de uracilo en el ADN, debido a que esta coenzima es requerida por la enzima timidilato-sintetasa para la conversión de desoxiuridin monofosfato (dUMP) a desoxitimina monofosfato (dTMP), generando mutación e inestabilidad cromosómica del ADN (118).

Numerosos estudios describen una relación entre consumo de folatos, el desarrollo de adenomas y cáncer colorrectal. Al parecer la presencia de adenomas precedería por décadas al cáncer colorrectal (122). Los primeros efectos beneficiosos del ácido fólico fueron descritos en pacientes con colitis ulcerosa, en quienes se observaba 10 a 40 veces más de riesgo para desarrollar cáncer de colon. Estos pacientes presentaban una baja concentración sérica de folatos por el uso de sulfalazina, un medicamento con efecto antifolato, al que se sumaba una baja ingesta dietaria y un aumento de las pérdidas intestinales de folato secundarias a la inflamación. Aunque no siempre presentaban anemia megaloblástica, se observaba que la suplementación de ácido fólico reducía la incidencia de displasia colorrectal y de cáncer de colon (62%) (123).

De manera similar a lo observado en la colitis ulcerosa de los humanos, estudios en ratones de experimentación que desarrollan diarrea y colitis muestran una supresión de la carcinogénesis cuando su dieta es suplementada con un nivel de folatos cuatro veces superior. Sin embargo, también se ha observado, que la deficiencia de folato puede inhibir la incidencia de lesiones más severa cuando se compara con el grupo placebo (124).

Los estudios en modelos de ratones genéticamente predispuestos han proporcionado un importante apoyo al estudio de la relación causal entre bajos niveles de ingesta de ácido fólico y cáncer colorrectal, así como también, de un efecto protector que depende de la dosis de folato suplementado. Algunas investigaciones en animales muestran que la dosis de folato, así como el momento de la intervención, son críticos en el suministro de una quimiopreención segura y eficaz. Estos estudios describen que la suplementación de folato en altas dosis, después de la existencia de focos neoplásicos microscópicas en

la mucosa colónica, tendría un efecto promotor para el desarrollo de cáncer colorrectal (125).

Tanto los estudios en animales, así como algunas observaciones clínicas, sugieren que el folato posee un efecto modulador dual en la carcinogénesis que dependería del momento y de la dosis de intervención. De este modo, la deficiencia de folato tendría un efecto inhibitor, mientras que la suplementación con folato un efecto promotor en la progresión de los tumores establecidos. En contraste, la deficiencia de folato en los tejidos epiteliales normales parece predisponer a la transformación neoplásica, mientras que niveles superiores de suplementación de ácido fólico suprimiría el desarrollo de tumores. Un estudio en ratas *Apc^{min/+}* con un seguimiento durante 36 semanas mostró que el número de focos de criptas aberrantes encontrados era mayor con la ingesta elevada de ácido fólico y cuando el nivel de homocisteína era bajo. En este estudio no se observaron diferencias significativas para cáncercolorrectal, sin embargo sugiere, que la suplementación puede promover la progresión de tumores cuando existen criptas aberrantes (126,127).

Estudios epidemiológicos y clínicos han mostrado que tanto la ingesta de folato en la dieta, como el nivel de folato en la sangre, se asocian inversamente con el riesgo de cáncer colorectal sugiriendo una reducción del riesgo de cáncer colorectal cercana al 40% en individuos con ingestas elevadas de folato dietario en comparación con aquellos que tienen un menor consumo (3,128,129).

La asociación inversa entre folato y riesgo de cáncer colorrectal se ha descrito en numerosos estudios de cohorte en sujetos con un mayor consumo de folato (129-131). Esta misma asociación se ha observado en relación a cáncer de colon y adenomas colorectales (129-131). Sin embargo, algunos estudios contradicen estos hallazgos reportando que la suplementación de ácido fólico podría tener efectos adversos para el desarrollo del cáncer colorectal. Un estudio caso-control anidado en una cohorte sueca muestra que los niveles de folato plasmático se relaciona con un mayor riesgo para desarrollar cáncer colorectal de una manera dual, observándose que tanto los niveles más elevados de folato plasmático, así como también, los niveles más bajos se relacionarían con un mayor riesgo (OR=2.0; IC95% 1.13-3.56 y OR=1.34 IC95% 0.72-2.5 respectivamente). También se describe que los individuos con un seguimiento

superior a 4,2 años, mostraban un mayor riesgo para desarrollo de cáncer colorrectal (OR=3.87; IC95%1.52-9.87; p tendencia=0,007) cuando presentaban niveles elevados de folato (132).

Estudios efectuados en humanos muestran que los niveles de folatos reflejan bien la concentración de folatos en la mucosa del colon, siendo más significativas en individuos que no ingieren niveles suprafisiológicos de folatos. También la homocisteína puede predecir el nivel de folato en mucosa colorrectal (133). Esto también ha sido observado en animales con dietas deficientes de folato quienes presentan bajos niveles de folatos en la mucosa del colon (134). Sin embargo, la asociación entre niveles sanguíneos de folato y cáncer colorrectal es diferente cuando se analiza adenomas y cáncer, siendo menos consistente cuando se compara la ingesta de fólico dietario en relación a adenomas que a cáncer. Esto puede ser explicado porque el efecto del folato en la mucosa colorrectal no depende exclusivamente del folato sérico, debido a que la mucosa intestinal está expuesta al folato presente en el lumen intestinal que no se ha absorbido o que es sintetizado en pequeñas cantidades por la microflora (3,135). Esto sugeriría que, aún en ausencia de deficiencia de folato sanguíneo, puede existir una deficiencia en la mucosa intestinal que predisponga a una neoplasia en sujetos con mayores riesgos. Estudios desarrollados para medir el contenido de folato en células neoplásicas de colon y su relación con tejidos adyacentes y niveles circulantes de folato muestran que las células epiteliales malignas del colon presentan una relativa deficiencia localizada de folato. Sin embargo, no aparece una deficiencia de folato generalizada en la mucosa sugiriendo que los suplementos de folato no inhibirían la carcinogénesis a través de la corrección de la deficiencia localizada de folato (136). Basado en estos resultados, se ha planteado como hipótesis que los individuos predispuestos a desarrollar cáncer, podrían tener una alteración en la captación intracelular, retención y exportación del folato que llevaría a su depleción en las células colorrectales (3).

Otros factores que pueden modular la relación entre folato y cáncer colorrectal son el alcohol, un conocido antagonista del folato, así como, la existencia de polimorfismos genéticos que pueden determinar un cambio en la homeostasis del folato intracelular. Esta homeostasis depende de la MTHFR, una enzima crítica para mantener la reserva de nucleótidos y la síntesis de ADN, así como también, un adecuado nivel de 5-metil-

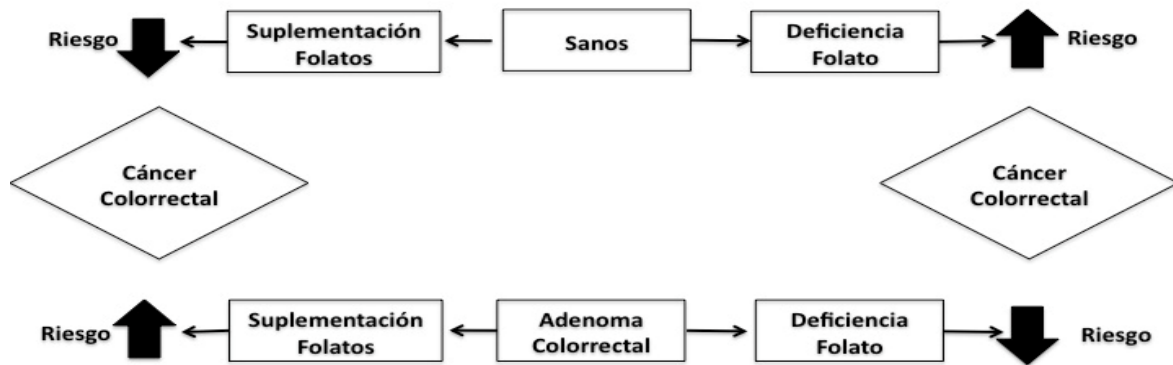
THF necesario para la provisión de SAM y las reacciones de metilación (137).

La presencia de polimorfismos de algunas de las enzimas ligadas al ciclo del folato también se relacionarían con el desarrollo de cáncer colorrectal. Se describe que la mutación asociada al polimorfismo de la MTHFR C677T muestra una menor actividad y termolabilidad de la enzima MTHFR. Como consecuencia, a nivel celular se produce una disminución de 5-metil-THF y una acumulación de 5-metilen-THF. Esto deriva en un incremento del nivel de homocisteína en individuos con niveles bajos de folato. Se ha observado que los portadores de este polimorfismo presentan un menor riesgo de cáncer colorrectal cuando los niveles de folato y de otros nutrientes asociados son normales, pero un mayor riesgo cuando los niveles de folatos son bajos (138,139).

Estudios en animales, seres humanos e in-vitro sugieren que los efectos de la deficiencia de folato en la metilación del ADN es muy compleja y dependería del tipo de célula, órgano diana y de la etapa de la transformación celular que serían gen y sitio específico. Los efectos de la deficiencia de folato en células colorrectales normales se relacionarían con la rotura de la cadena del ADN, la inestabilidad cromosómica y genómica, la incorporación del uracilo, el fallo en la reparación del ADN y el incremento de las mutaciones. La suplementación del folato en células normales corregiría estos defectos manteniendo la integridad y estabilidad del ADN, optimizando su reparación al entregar los precursores necesarios. Se ha observado en estudios en animales y seres humanos que la suplementación de folatos en este tipo de células pareciera aumentar la extensión de la metilación del ADN, ya sea previniendo o revertiendo la hipometilación, suprimiendo la transformación neoplásica (140).

Por otra parte, en lesiones preneoplásicas y neoplásicas donde la replicación del ADN ocurre de manera acelerada, la deficiencia del folato produciría una síntesis inefectiva de ADN que generaría inhibición del crecimiento tumoral. Este mecanismo es la base sobre el cual opera la quimioterapia para cáncer por antifolatos. Se hipotetiza también, que la deficiencia de folato podría reactivar los genes supresores de tumores y otros genes anticánceres al revertir la metilación de las islas CpG promotoras de genes. En cambio, la suplementación de folato en cánceres podría promover la progresión de las lesiones a través de la provisión de nucleótidos que contribuyen a su acelerada división (141,142) (Figura 4).

Figura 4. Modelo del efecto dual del folato en el desarrollo del cáncer colorrectal.



Una serie de meta-análisis han sido desarrollados para revisar la relación entre folatos y cáncer de colon que incorporan diversos modelos de estudios en animales de experimentación, caso-control, cohorte y ensayos clínicos, sin embargo, las conclusiones muestran resultados heterogéneos. Un meta-análisis publicado en el año 2005 que incorpora siete estudios de cohorte y nueve estudios caso-control muestra una asociación inversa entre ingesta de folato y cáncer colorrectal, especialmente asociado al consumo de folatos dietarios (RR=0.75; IC95% 0.64-0.89), pero no para folatos totales (dieta y suplementos) (RR=0.95; IC95% 0.61-1.05) sugiriendo un pequeño efecto protector aún cuando el efecto de otras variables (factores dietarios) en el resultado no pueden ser desconocidas (143).

Los metaanálisis publicados a partir del año 2010 que incluyen estudios de cohorte muestran diferentes resultados en relación a riesgo de cáncer de colon y folato. Kennedy et al. (144) incluyeron en total 27 estudios (18 caso-control y 9 cohorte) donde se comparó una alta versus una baja ingesta de folato. Los resultados muestran la existencia de una disminución significativa del riesgo en los estudios caso control (RR=0.85; IC 95% 0.74-0.99), pero no en los estudios de cohorte (RR=0.92; IC95%

0.81-1.15). Kim et al. (145) publicaron en el año 2010 un meta-análisis que muestra un efecto preventivo cuando compara ingesta de folato total ($\geq 520 \mu\text{g/día}$ versus $\leq 240 \mu\text{g/día}$) (RR=0.87; IC95% 0.78-0.98). En este estudio se observa que por cada incremento de $100 \mu\text{g/día}$ de folato se logra una reducción del riesgo de cáncer colorrectal de 2%. A diferencia de los metaanálisis anteriores, otro estudio que incluyó 8 estudios caso-control anidado en cohortes y que comparó dos niveles de folato sérico no demostró una asociación entre folato y cáncer colorrectal (146).

Un metaanálisis de 77 estudios observacionales para evaluar ingesta de folato, cáncer colorrectal y polimorfismos de la enzima MTHFR encontró una reducción significativa del riesgo bajo condiciones de alta ingesta de folato (RR=0.7; IC95% 0.56-0.89 y RR=0.63; IC95% 0.41-0.97 respectivamente) para el genotipo 677 TT y CC (147).

Cuatro metaanálisis que incluyen estudios clínicos randomizados no muestran una disminución del cáncer colorrectal o de adenomas colorrectales cuando se compara una suplementación entre 0.5 a 1 mg/día de ácido fólico (148-151). A diferencia de estos estudios, un meta-análisis desarrollado por Fife et al. (152) no encontró un efecto preventivo en la recurrencia de adenoma colorrectal en aquellos que recibieron suplementos de ácido fólico por menos de 3 años. En aquellos con más de 3 años de tratamiento se observa un aumento de riesgo de adenoma colorrectal (RR=1.35; IC95% 1.06-1.7), así como también, de adenomas avanzados incluyendo cáncer colorrectal (RR=1.5; IC95% 1.06-2.1).

Otros cánceres han sido relacionados también con el nivel de folato mostrando un efecto preventivo en el caso de cáncer pancreático (153) y cáncer de pulmón (154) tanto para consumo de folatos dietarios o como suplementación de ácido fólico. Otros estudios de cohorte describen un probable mayor riesgo para cáncer de próstata, aún cuando los resultados siguen siendo contradictorios. Un metanálisis que evaluó su relación con algunos polimorfismos (MTHFR C677T, MTR A2756G, MTHFD1 G1958A, SLC19A1/RFC1 G80A, SHMT1 C1420T y FOLH1 T1561C), no observó la existencia de mayores riesgos (155, 156). Dos metaanálisis recientes muestran que en general, no se observa un aumento o disminución de la incidencia de cáncer en un período de observación de cinco años de fortificación universal con ácido fólico (150) o

de suplementación con ácido fólico, observándose solo una reducción en el caso del melanoma (147).

2.5 Enfermedad cardiovascular

La relación entre homocisteína y riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) fue descrita a partir de la observación de la homocistinuria clásica, una enfermedad recesiva que se produce por deficiencia de la enzima cistation-sintetasa y que da como resultado niveles muy elevados de homocisteína plasmática. Ésta se caracteriza por retraso mental, anomalías esqueléticas, dislocación del cristalino y una marcada tendencia a desarrollar aterosclerosis en forma prematura y severa asociada eventos tromboembólicos (157).

El año 1976 se publicó el primer estudio que mostraba una diferencia en el nivel de homocisteína entre pacientes con enfermedad vascular y sujetos normales (158). A partir de ese momento se han desarrollado numerosos estudios que han buscado precisar la existencia de esta asociación. La existencia de una relación inversa entre ingesta de folato y nivel de homocisteína ha sido claramente establecida, sin embargo, los resultados entre la asociación con indicadores bioquímicos de folato, homocisteína y riesgo de ECV son conflictivos.

Se han propuestos varios mecanismos mediante el cual la homocisteína causaría disfunción endotelial. Éstos podrían estar mediados por estrés oxidativo, debido a una alteración de la actividad y expresión de la enzima intracelular glutation-peroxidasa que reduciría la capacidad para eliminar radicales hidroxilo. Se ha observado, además, una reducción de la enzima superóxido-dismutasa que aumentaría la peroxidación de lípidos y de las lipoproteínas de baja densidad, aumentando de este modo, la carga oxidativa (159). También se ha descrito un aumento en la disfunción endotelial por disminución del factor tumoral de necrosis alfa, que induciría la formación de moléculas de adhesión endotelial intercelular (ICAM-1), moléculas de citoadhesión vascular (VCAM-1) y E-selectina. El daño endotelial podría producirse además por apoptosis, al sobreregular la muerte celular. Por otra parte, altos niveles de homocisteína inhibirían la producción de proteínas debido a la hipometilación de algunos genes promotores, tal como se observa en el caso de la ciclina A-18 responsable de la progresión dentro del ciclo de

crecimiento de las células endoteliales, de este modo, se detendría su crecimiento evitando la sustitución de las células dañadas (160). Otros mecanismos descritos en relación a elevación de homocisteína dice relación con una reducción de la vasodilatación del endotelio dependiente de los niveles plasmáticos de la dimetil-arginina-asimétrica, un potente inhibidor de la óxido nítrico-sintetasa que disminuiría la producción de endotelina-1 (161). La homocisteína puede además, aumentar la trombosis por un aumento de la actividad de los factores de la coagulación V y XII y de la expresión de los factores tisulares en el endotelio en el músculo liso de las arterias. La reducción en la actividad de la proteína-C y la trombodulina produciría un aumento en la actividad de la cascada de la coagulación y de la agregación plaquetaria, sumado a una inhibición de la trombolisis por disminución de la actividad del activador tisular de plasminógeno, todos los cuales contribuirían a aumentar el riesgo de enfermedad cardiovascular (162).

Los primeros estudios observacionales desarrollados en relación a homocisteína mostraban que los pacientes con enfermedad coronaria (EC) o con accidente vascular encefálico (AVE) presentaban niveles de homocisteína entre 3 a 5 $\mu\text{mol/L}$ más elevado que el grupo control ajustando por edad y sexo. En el año 1995 un estudio mostró que un incremento de 5 $\mu\text{mol/L}$ se asociaba con un 70% mayor riesgo para ECV (163). Sin embargo, una serie de estudios prospectivos posteriores mostraron que la asociación existente era menor (11% para EC y 19% para AVE) (164,165).

Un meta-análisis desarrollado con posterioridad que evaluó la respuesta de la homocisteína a la suplementación de vitaminas mostró una reducción en el nivel de homocisteína de 23% cuando se suplementaba con ácido fólico y de 30% cuando se adicionaba vitamina B₁₂. En las poblaciones de países con fortificación universal con ácido fólico el descenso del nivel de homocisteína era menor (20%) (166).

Una revisión de los meta-análisis de estudios clínicos randomizados a partir del año 2008 en relación a suplementación de folato, homocisteína y eventos cardiovasculares muestran que en algunos de ellos no se observan beneficios en la reducción del riesgo de ECV (167-170). Sin embargo, solo se observaría un efecto beneficioso cuando el análisis considera los niveles basales de homocisteína, siendo mayor el efecto en aquellos sujetos con niveles de homocisteína $\geq 12\text{nmol/L}$ (RR=1.06; IC95% 1-1.13)

frente a aquellos con niveles ≤ 12 nmol/L (RR=0.94; IC95% 0.86-1.13) (171). También se observa que el impacto de la suplementación con ácido fólico podría ser mayor cuando se asocia a otras vitaminas (RR=0.84; IC95% 0.74-0.94). Por otra parte, dos metaanálisis de estudios clínicos randomizados publicados en el año 2012 muestran un efecto beneficioso para prevenir AVE, especialmente en población sin fortificación de alimentos (RR=0.88; IC95% 0.81-0.96 y RR=0.89; IC95% 0.82-0.87) (172,173). Esta misma asociación se describe para un meta-análisis de estudios prospectivos, en relación a riesgo de enfermedad coronaria, especialmente cuando la ingesta de folato dietario es >200 $\mu\text{g}/\text{día}$ (RR=0.88; IC95% 0.82-0.94). En este mismo estudio el análisis de la función dosis-respuesta muestra que por cada 5 nmol de incremento de folato sanguíneo se observaría un descenso del riesgo de 8% (RR=0.92; IC95% 0.84-1.00) (174). Un metaanálisis de ensayos randomizados que analiza la relación entre folato, vitaminas B₆ y B₁₂ y reducción de homocisteína y la progresión de aterosclerosis medida por engrosamiento de la íntima-media carotídea muestra un mejoría tanto del flujo sanguíneo como del espesor carotídeo, especialmente en sujetos con daño renal o alto riesgo vascular (175), aún cuando otro meta-análisis muestra similares resultados pero solo en estudios de corto seguimiento (176).

Dos metaanálisis de estudios randomizados recientemente publicados que evalúan la relación entre folato, niveles de homocisteína y riesgo cardiovascular en pacientes con diferentes variantes genéticas muestran que no hay impacto en el riesgo cardiovascular (177,178). Otro metaanálisis basado en estudios caso-control que incluye estudios no publicados previamente, así como también, resultados de estudios publicados muestra que en los no publicados, los portadores de la variante genética MTHFR C677T presentaban niveles de homocisteína un 20% más alta, especialmente en la variedad TT cuando se comparaba con CC. En este grupo de estudios no publicados, no se observan efectos beneficiosos para riesgo de EC en individuos suplementados (RR=1.01; IC95%: 0.95-1.07). En cambio, los resultados de estudios publicados muestran un efecto positivo para la suplementación (RR=1.12; IC95% 1.04-1.21) sugiriendo la existencia de un sesgo en las publicaciones o problemas de tipo metodológico (179).

Dos metaanálisis de estudios clínicos randomizados que evalúan el efecto de la suplementación en enfermos renales no muestran una reducción de los eventos cardiovasculares en pacientes con o sin diálisis (180,181). Sólo un meta-análisis

muestra una reducción efectiva en pacientes sin historia de suplementación de ácido fólico (RR=0.82; IC95% 0.7-0.96) y con enfermedad renal crónica avanzada (RR=0.85; IC95% 0.77-0.94)(182).

El folato y la vitamina B₁₂ son importantes reguladores del nivel de homocisteína plasmática, sin embargo, su efecto en la prevención de problemas cardiovasculares continúa siendo poco concluyente. Probablemente el desarrollo de nuevos estudios categorizando los individuos según nivel de homocisteína basal y controlando según fortificación de alimentos o ingesta de suplementos puedan aclarar la relación la prevención de ECV, especialmente de los AVE.

3. Indicadores Bioquímicos

El folato y de la vitamina B₁₂ son vitaminas que están estrechamente ligadas en el metabolismo monocarbonado. De este modo, las manifestaciones de deficiencia de ambas son idénticas e indistinguibles, así como también, sus complicaciones hematológicas (183). Para un adecuado tratamiento de estas deficiencias es necesario contar con indicadores bioquímicos que permitan distinguir los efectos de la deficiencia en forma separada, así como también, evaluar el efecto del exceso de alguna de ellas. También es importante contar con indicadores bioquímicos que permitan evaluar la eficacia de los programas de intervención nutricional como, por ejemplo, la fortificación universal de alimentos o la entrega de suplementos vitamínicos a grupos especiales (184).

Los indicadores que evalúan el estado nutricional del folato en el organismo se pueden clasificar en indicadores directos que son aquellos que miden el folato en la sangre e indicadores funcionales que miden los metabolitos que se acumulan por efecto de la deficiencia (185).

3.1 Indicadores directos

3.1.1 Folato eritrocitario

La medición de folato eritrocitario refleja el nivel de los depósitos tisulares de folato. Estudios muestran que el nivel encontrado en el eritrocito correlaciona adecuadamente

con los depósitos en otros tejidos, observándose solo una correlación débil con el encontrado en el hígado (6).

El folato eritrocitario se considera un indicador del estado nutricional del folato en el tiempo ya que refleja el nivel promedio existente en los 120 días previos a la medición. Esto se explica porque el folato es incorporado al eritrocito sólo durante su desarrollo en la médula ósea (eritropoyesis) y no en la forma madura que circula en la sangre con una vida media de 120 días (185).

Una de las limitaciones a considerar cuando se mide folato eritrocitario es la existencia de algunos polimorfismos genéticos de las enzimas participantes en el metabolismo del folato que afectan su nivel, así como también, la influencia de otras vitaminas, especialmente niacina, vitamina B₂, vitamina B₆, vitamina B₁₂, que intervienen en las reacciones donde también participa el folato. También su nivel puede verse afectado por el nivel de hierro, zinc, proteínas y otros nutrientes y por la presencia de enfermedades infecciosas y algunas parasitosis (186).

Numerosos estudios muestran que el límite más bajo de normalidad del folato eritrocitario es de alrededor de 140 ng/ml (305 nmol/L) cuando se considera la aparición de enfermedad con evidencia morfológica o bioquímica de hematopoyesis megaloblástica. El punto de corte para el balance negativo de folato eritrocitario ha sido propuesto por diferentes autores considerando diferentes riesgos y problemas en salud tal como se muestra en la Tabla 2 (187-189).

Tabla 2. Criterios para definir balance negativo de folato eritrocitario.

Folato eritrocitario	Anemia megaloblástica*	Incremento de homocisteína**	Defectos de Tubo Neural***
nmol/L	<305	<340	<906
µg/L	<135	<150	<400

* Balance negativo que puede causar anemia megaloblástica

**Patologías funcionales asociadas con incremento de la homocisteína

*** Aparición de defectos del tubo neural

Fuente: Dary O. Nutritional interpretation of folic acid interventions. Nutr Rev 2009;67(4):235-244.

3.1.2 Folato Plasmático

El folato sérico es considerado un indicador sensible de ingesta de folato dietario. A diferencia del folato eritrocitario que se mantiene constante, el folato sérico varía durante el día con el ayuno, con la ingesta de alimentos y no es una medida segura para evaluar el estado del folato porque no permite distinguir entre un descenso transitorio o un déficit crónico de folato, sin embargo, si se desarrollan mediciones repetidas resulta ser un indicador adecuado para observar la tendencia. Sin embargo, cuando se trata de estudios poblacionales, el folato plasmático se ha considerado una medida adecuada para evaluar el estado general del folato (189).

Aunque no se ha definido un nivel de folato asociado a efectos adversos que deriven de una ingesta excesiva, algunos autores sugieren que un punto de corte superior a 45 nmol/L (20 µg/L) constituiría una propuesta razonable. Este punto de corte mostraría que la capacidad de procesar altas ingesta de folato, especialmente de ácido fólico, ha sido sobrepasada sugiriendo que no existe una razón para incrementar la ingesta total de folato más allá de este punto (186,190).

El punto de corte para el balance negativo y positivo del nivel de folato sérico ha sido propuesto por diferentes autores (187,188,189,191) considerando diferentes riesgos y problemas en salud (Tabla 3).

Tabla 3. Puntos de corte para definir deficiencia y exceso de folato sérico/plasmático.

Folato sérico/plasmático	Anemia megaloblástica*	Incremento de homocisteína**	Defectos de Tubo Neural***	Nivel Suprafisiológico
nmol/L	<7	<10	<15.9	≥45.3
µg/L	<3.1	<4.4	<7.0	≥20

* Balance negativo que puede causar anemia megaloblástica

**Patologías funcionales asociadas con incremento de la homocisteína

*** Ocurrencia de defectos del tubo neural

Fuente: Dary O. Nutritional interpretation of folic acid interventions. Nutr Rev 2009;67(4):235-244.

3.1.3 Ácido Fólico sérico

Considerando los resultados de algunos estudios que muestran la aparición de pequeñas cantidades de ácido fólico en individuos sanos que consumen suplemento de ácido fólico (34,190-192) o en países que fortifican alimentos, algunos laboratorios han empezado a determinar ácido fólico libre sin metabolizar. Estas mediciones se realizan a manera de investigación como consecuencia de la observación de efectos deletéreos en las vías metabólicas de folato y vitamina B₁₂ cuando su consumo excede los 800 µg/día (186).

3.2 Indicadores funcionales

3.2.1 Homocisteína sérica/plasmática

La homocisteína es un intermediario en el metabolismo de los aminoácidos azufrados y es parte del ciclo de la metionina y del ácido fólico. La homocisteína se forma a partir de la metionina, un aminoácido esencial, a través de numerosas reacciones de transferencia de grupos metilo. Su metabolismo depende de varias vitaminas del complejo B incluyendo folato, vitamina B₁₂ (cobalamina), B₆ (piridoxina) y B₂ (riboflavina) (193).

Un desequilibrio entre la formación y eliminación de homocisteína y la eliminación llevará a cambios en sus concentraciones plasmáticas. El aumento en la concentración de homocisteína plasmática (hiperhomocisteinemia) se produce cuando las cantidades de folato son inadecuadas para donar los grupos metilos que son requeridos para la conversión de homocisteína a metionina, pero también cuando existe un déficit de vitamina B₁₂ (194).

La hiperhomocisteinemia es importante no sólo como indicador de déficit de folato o vitamina B₁₂, sino que también, como factor de riesgo independiente para otras enfermedades como complicaciones del embarazo, defectos del tubo neural, desórdenes mentales y alteraciones en las funciones cognitivas en el adulto mayor (195).

En estudios poblacionales se ha encontrado que el riesgo atribuible poblacional (RAP) del nivel de folato en relación a hiperhomocisteinemia es alto, alcanzando el 25% en población que no consume alimentos fortificados y no recibe suplementos vitamínicos de folato, frente a lo observado en países que han implementado la fortificación de

alimentos donde el RAP de folato para hiperhomocisteinemia alcanza solo al 1%, siendo en estos países, el nivel de vitamina B₁₂ la causa modificable más común de niveles elevados de homocisteína (196).

La correlación entre niveles de homocisteína circulante y los niveles séricos de folato y vitamina B₁₂ es negativa, observándose que en individuos con déficit severo de estas vitaminas, los niveles de homocisteína incrementan en forma abrupta pudiendo alcanzar niveles semejantes a los observados en la homocistinuria (197).

Se debe tener presente que el alza en los niveles de homocisteína constituye sólo una evidencia presuntiva de una deficiencia de vitaminas. Cuando existe la sospecha de déficit de alguna de estas vitaminas debe considerarse otras causas distintas a las nutricionales, que generan una elevación de la homocisteína. Se describe que los niveles difieren según sexo, observándose mayores niveles en hombres que en mujeres. Por otra parte, las mujeres presentan mayores niveles con la menopausia y en general su nivel aumenta con la edad. Se observa además, una hiperhomocisteinemia asociado a la existencia de polimorfismos y desórdenes genéticos especialmente dependientes de las enzimas cistation-B-sintetasa y de la MTHFR (198). También se observa hiperhomocisteinemia en algunas patologías como insuficiencia renal e hipotiroidismo. También se encuentra niveles elevados asociados al uso de algunos medicamentos anti-Parkinson (L-dopa), drogas antiepilépticas, anticonceptivos y antagonistas de la vitamina B₁₂ y B₆ (199-204).

Durante el embarazo, las concentraciones medias y los límites de referencia superiores de homocisteína son inferiores a otras etapas de la vida lo que puede ser explicado en parte por la hemodilución y la reducción de albúmina plasmática durante el embarazo, así como también por un efecto hormonal (205).

El rango de normalidad de la homocisteína en adultos varía entre 5-15 µmol/L. Se define como hiperhomocisteinemia valores sobre 15 µmol/L y se considera un alza moderada cuando los niveles alcanzan sobre 15.3 µmol/L, intermedia sobre 30 µmol/L y severa sobre 100 µmol/L (195). En niños entre 8 a 12 años los niveles normales corresponden a la mitad de los observado en adultos y no se observan diferencias entre hombres y mujeres (5.25 µmol/L con un rango de 2.9 a 7.6 µmol/L para 2 desviaciones estándar). En la pubertad los niveles de homocisteína aumentan y la

distribución entre hombres y mujeres es semejante a lo observado en adultos (206).

3.3 Ensayos para evaluación de indicadores bioquímicos

3.3.1 Determinación de folatos

La medición del folato plasmático y eritrocitario han sido utilizados tanto en estudios epidemiológicos como en la determinación de deficiencias a nivel individual. El organismo de elección para determinar el folato plasmático ha sido el ensayo microbiológico utilizando *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC7469) conocido como *Lactobacillus casei* (L. Casei) (207).

Éste responde a todas las formas de folato monoglutámico incluyendo al ácido fólico (208). El establecimiento y mantenimiento de un pH adecuado (pH 6,2) durante el ensayo permite obtener el mismo nivel de crecimiento para 5-metil-THF y otras formas de folato (209). Los valores de folato sérico y eritrocitario obtenido con el ensayo de *Lactobacillus casei* han constituido la base para la definición de puntos de corte que indican suficiencia de folato y para la definición de las actuales ingestas dietéticas de referencia (210).

El método microbiológico utilizando *L. Casei* es un ensayo de alta sensibilidad y de bajo costo que no requiere una instrumentación sofisticada. La composición del medio está bien definida y los investigadores pueden prepararlo en el laboratorio o comprarlo. El crecimiento bacteriano se controla normalmente mediante dispersión de la luz. También se puede medir con un pH-metro porque estas bacterias de ácido láctico producen lactato disminuyendo el pH en forma importante durante su crecimiento (207).

L. casei puede transportar también cadenas largas de poliglutamatos, aún cuando la afinidad disminuye con la elongación de la cadena y se convierte en una limitante para el crecimiento. De este modo, las curvas obtenidas en respuesta a la concentración de folato con poliglutamatos con más de tres cadenas son menos exponencial que las obtenidas con di o triglutamatos impidiéndola normalización de curvas de crecimiento obtenidas con poliglutamatos de cadena larga, a partir de las curvas obtenidas con los monoglutamatos (211).

Para análisis de folato eritrocitario, los poliglutamatos de los eritrocitos requieren ser hidrolizados a tri-glutamatos o a glutamatos de cadenas más corta. Considerando que L. casei responde en forma adecuada a los di y tri-glutamatos, la hidrólisis incompleta de los poliglutamatos no altera los resultados (208).

La presencia de antifolatos, metotrexato o drogas antibacterianas pueden causar una subestimación de la concentración de folatos por inhibición del crecimiento bacteriano. Sin embargo, cuando se sospecha presencia de antibióticos se pueden usar cepas resistentes (212).

Otros ensayos desarrollados posteriormente utilizan enzimas, radioisótopos y quimioluminiscencia y han reemplazado al método microbiológico por su disponibilidad comercial en forma de estuches comerciales (*kit*).

Dentro de ellos, los métodos de unión competitivos han sido ampliamente usados desplazando el método microbiológico debido a su facilidad de uso y disponibilidad comercial. Los ensayos iniciales de unión competitiva a proteínas fueron desarrollados en base a aglutinantes de folato de suero o leche debido a que la leche contiene una proteína de unión de alta afinidad con el folato (receptor de folato) (213).

Estos ensayos basados en uniones competitivos, a diferencia de la métodos de ensayo microbiológicos, miden el uso metabólico del folato para crecimiento, es decir, miden la competencia para un aglutinante de folato entre un folato marcado y uno estándar sin etiqueta. En las muestras biológicas, la capacidad de los folatos para competir con el folato marcado dependerá de sus afinidades relativas a la proteína de unión. El ácido fólico tiene mayor afinidad que el 5-metil-THF a las proteínas de unión del folato, en cambio es menor para el formil-THF lo que puede determinar falsas concentraciones (214).

Por otra parte, las mediciones de folato en eritrocitos precisan de una completa conversión en monoglutamatos. También pueden existir diferentes afinidades de los distintos monoglutamatos para el aglutinante, que no representan un problema si el 5-metil-THF es la forma predominante. Sin embargo, estas diferentes afinidades se convierten en un problema cuando existen concentraciones significativas de otras formas de un carbono tal como ocurre en los eritrocitos de los portadores de polimorfismos de la MTHFR C677T (215).

El rango de concentración de folato que se puede medir con estos ensayos es 2-20 ng/mL. Esto cubre concentraciones de folato sérico inferior menor a lo que se observa en la era de la fortificación de alimentos, siendo necesario diluir las muestras de suero y los ensayos en eritrocitos debido a las altas concentraciones de folato. Estos ensayos han mostrado importantes variaciones en los resultados cuando se compara con el método microbiológico (216).

Todos estos métodos son propensos a problemas de seguridad y precisión que deben ser considerados y controlados cuando se analizan los resultados. Esto se debe a que ellos están basados en las propiedades de la proteína unida al folato, que varía según las distintas fuentes de origen y que puede variar ampliamente entre los diferentes ensayos para folatos. Por ejemplo, otros análogos del folato (ácido pterico, fármacos antifolato), se pueden unir a la proteína en lugar de folato y conducir a una sobreestimación de las concentraciones (217).

Para estudios poblacionales e individuales actualmente se utilizan los “ensayos basados en “kit” automáticos o semiautomáticos y que cuentan con rigurosas pruebas de control de calidad y procedimientos de validación. El problema más serio con el uso de “ensayos basados en kit” se vivió en Estados Unidos en la etapa pre-fortificación de harina de trigo. Para la medición de folato sérico y eritrocitario, en la encuesta nacional de salud y nutrición (NHANES), se utilizó un ensayo calibrado con un estándar de ácido fólico que contenía un 30% menos que el folato declarado, que resultó en una sobrestimación del nivel de folato, que ha requerido desarrollar un factor de corrección en forma retrospectiva. A partir del año 2007 se ha reincorporado el método microbiológico considerando su precisión, ya que recupera distintas formas de folato por igual, lo cual no es siempre el caso con los ensayos de unión a proteínas clínicas (185,218).

Otro método recientemente utilizado para medir folato es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS en su acrónimo en inglés). Los estudios muestran que éste permite detectar casi todas las formas de folato y logra una buena correlación con el método microbiológico y tiene como ventaja que permite medir distintas formas de folato (219).

3.3.2 Determinación de homocisteína

Los métodos para medir homocisteína se introdujeron a mediados de la década de 1980. En todos los ensayos, el suero o plasma es tratado inicialmente con un agente reductor que convierte todas las especies de homocisteína en una forma reducida que se mide en forma directa o en forma indirecta. Estos ensayos incluyen cromatografía líquida de alta presión (High Pressure Liquid Chromatography; conocida en inglés con el acrónimo “HPLC”), cromatografía de gases–espectrometría de masas (GC/MS), ensayos radioenzimáticos e inmunoensayos (220).

Los diferentes métodos de homocisteína dan resultados comparables pero se ha observado que las variaciones entre los métodos y entre los laboratorios son considerables (221). Una vez obtenida la muestra, pero antes que se separen las células sanguíneas, se observa un aumento en la concentración de homocisteína que depende del tiempo y la temperatura. A temperatura ambiente, la concentración aumenta un 1 $\mu\text{mol/L/h}$ debido a que, a esta temperatura, los eritrocitos exportan homocisteína al plasma, por lo que se deben tomar ciertas precauciones preanalíticas para no obtener resultados notablemente falseados. Este aumento en la concentración de homocisteína puede prevenirse con la inmediata centrifugación y la separación de las células sanguíneas o con la colocación inmediata de la muestra de sangre en hielo hasta su centrifugación (222).

Se recomienda que la medición se realice en el plasma debido a que el uso de anticoagulante permite el procesamiento de la muestra inmediata. En el suero, aún cuando se prepare de manera óptima, se obtiene valores más altos que en el plasma y esta diferencia aumenta en la recolección del suero cuando mayor es el tiempo que se permite para la coagulación de la muestra de sangre (221).

Algunos factores que determinan variaciones en sus niveles pueden estar dadas por la posición del individuo en la toma de muestra, observándose que cuando éste se encuentra en posición supina, los valores incrementan en 10% en relación a las muestras tomadas cuando el individuo está sentado (223).

También existen variaciones durante el día siendo mayor en el día que en la noche, lo que depende de la cantidad y tipo de alimento consumido (224). Una ingesta importante de alimentos ricos en proteínas puede aumentar la concentración de la homocisteína

plasmática hasta un 10-15% después de 6-8 h (225).

4. Requerimientos de folato

4.1 Biodisponibilidad

La biodisponibilidad del folato se define como la fracción del folato ingerido que es absorbido y utilizado en los diferentes procesos metabólicos (226,227). Su absorción puede variar dependiendo del tipo de alimentos, el pH en la mucosa yeyunal, la velocidad de tránsito intestinal o la inactivación de la enzima pteroil-poliglutamato-hidrolasa, así como también, de los diferentes componentes presentes en los alimentos. La biodisponibilidad puede estar influenciada por condiciones fisiológicas tales como la etapa de crecimiento, el embarazo o la lactancia o por patologías, como por ejemplo, los síndromes de mala-absorción (228).

Evaluar la biodisponibilidad del folato es un requisito para formular recomendaciones nutricionales. La biodisponibilidad del folato contenido en los alimentos se ha estimado en alrededor de 50% en relación a la biodisponibilidad del ácido fólico (229). En humanos se han utilizado diferentes protocolos de estudios para medir su incremento en el plasma, eritrocito u orina, ya sea después de entregar una dosis única o dosis múltiples, así como también, utilizando técnicas isotópicas basadas en la recuperación de folato marcado o de metabolitos en orina.

Dentro de las variables usadas para comparar las respuestas entre diferentes tratamientos está la medición del área bajo la curva (ABC) que permite estimar la respuesta en el plasma. Esta medición considera que el nivel de folato posterior a la dosis, corresponde a la fracción de folato absorbido después de una sola dosis. De esta forma, se compara la absorción relativa de folatos de un determinado alimento con una dosis de referencia de folato suplementado, generalmente ácido fólico (226). Se han descrito algunos problemas metodológicos con esta técnica cuando se intenta medir biodisponibilidad del folato. Una limitación está dada por el efecto del ayuno de los participantes, debido a que éste incrementa la concentración plasmática de folatos producida por la supresión de la circulación enterohepática. Esta supresión resulta en una menor eliminación de folatos y en una sobreestimación del ABC, pudiendo

estimarse equivocadamente la existencia de una mayor biodisponibilidad (231). Otro aspecto que puede influir en la estimación de biodisponibilidad es el nivel de folatos ingeridos previos a la medición. Estudios desarrollados en voluntarios con una pre-saturación de folatos en los depósitos corporales muestran que después de una prueba con una dosis oral única de folatos, se observó una mayor ABC sugiriendo que la ingesta previa de folatos es uno de los aspectos que deben ser controlados en los estudios y que podría explicar los diferentes resultados observados en la estimación de su biodisponibilidad (52,232).

Diversos autores destacan que el ácido fólico sintético y los folatos reducidos muestran diferentes efectos en la etapa de post-absorción aguda y en el nivel de folato plasmático durante el ayuno, así como también, después de intervenciones prolongadas (233,234). Recientemente se ha sugerido que pudiera no ser adecuado utilizar ácido fólico como referencia en estudios prolongados, donde se evalúa la biodisponibilidad relativa de los folatos naturales o donde se compara el incremento de la concentración de folatos plasmáticos. Cuando se examina el efecto de la suplementación crónica de folatos entre 100 a 400 µg/día algunos autores han descrito la misma biodisponibilidad para ácido fólico que para [6S]-5-metil-THF (233). Sin embargo, los resultados de estudios crónicos usando folato de los alimentos para estimar la biodisponibilidad relativa de folatos naturales y ácido fólico muestran una gran variación, ya que éstos dependen del alimento utilizado, así como también, del índice de respuesta considerado. Al comparar intervenciones con ácido fólico versus [6S]-5-metil-THF se ha observado incrementos del folato plasmático que pueden variar hasta en 36% (234).

La interpretación de la biodisponibilidad de folatos naturales es compleja, porque se precisa de un estricto cumplimiento de la dieta establecida en los protocolos de investigación. Es frecuente observar, en sujetos sometidos a estudios prolongados, una pérdida en la adherencia a la dieta establecida y una sustitución de algunos de los alimentos indicados. Esto no ocurre en los estudios desarrollados con ácido fólico, cuya mayor estabilidad, facilidad de entrega y consumo facilita el cumplimiento del protocolo por tiempos prolongados.

Algunos estudios de biodisponibilidad que han analizado la respuesta del nivel de folatos eritrocitarios, muestran que dosis cercanas a 400 µg/día de 5-metil-THF

determinan un incremento en la concentración (235) o un mantenimiento de los niveles (236) en forma significativamente mayor que el ácido fólico, sugiriendo que el uso de ácido fólico como folato de referencia no sería la forma más adecuada para estimar la biodisponibilidad del folato de los alimentos (234). Por otra parte, se ha observado, que el cambio en los niveles de folato eritrocitario es mayor, cuando mayor es la concentración de folatos al inicio del estudio, lo que podría sobreestimar la respuesta en voluntarios con concentraciones normales y subestimar las necesidades en sujetos deficientes (234).

El cuestionamiento que desarrollan algunos investigadores acerca de la validez de los estudios de biodisponibilidad que comparan ácido fólico con folatos naturales hace necesario desarrollar estudios que permitan dilucidar algunos aspectos de metabolismo del folato post-absorción en sus diferentes formas. Esto es de especial importancia considerando la alta ingesta de folatos derivadas de ácido fólico proveniente de la fortificación obligatoria de alimentos.

4.2 Ingesta Dietética Recomendada

4.2.1 Definiciones Generales

La ingesta dietética recomendada representa la cantidad necesaria de un nutriente para cubrir los requerimientos nutricionales en la mayor parte de la población sana, por grupos de edad, sexo y en situaciones fisiológicas especiales como el embarazo y la lactancia. Actualmente, se utiliza un término más amplio, ingesta dietética de referencia (IDR) que corresponden a valores de referencia que incluya no sólo la prevención del déficit de nutrientes, sino también la reducción de riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles (237).

4.2.1.1 Requerimiento Medio Estimado (RME)

Corresponde a la ingesta diaria estimada para cubrir las necesidades, conforme a lo definido por un indicador específico de adecuación nutricional, del 50% de los individuos aparentemente sanos en un grupo de edad, género o estado fisiológico. A este nivel de ingesta, la otra mitad del grupo especificado podría no tener cubierta las necesidades nutricionales. Por esto, el RME no se considera como recomendación de

consumo, sino como punto de corte para la inadecuación de una dieta en términos de ingesta de nutrientes. Es equivalente a “Estimated Average Requirement” (EAR) en inglés.

4.2.1.2 Ingesta Dietética Recomendada (IDR)

Se define como el nivel de ingesta diaria de un nutriente que atiende las necesidades del 97-98% de una población dada. Para la mayoría de los nutrientes, y considerando una distribución normal de las necesidades, la ingesta diaria recomendada puede ser calculada como $IDR = RME + 2$ desviaciones estándar de las necesidades. Asumiendo un coeficiente de variación de 10 a 15%, la $IDR = 1.2$ o $1.3 \times RME$. Es equivalente a “Recommended Dietary Allowances” (RDA) en inglés.

4.2.1.3 Ingesta Adecuada (IA)

Fue propuesta en vez del Requerimiento Medio Estimado cuando no existe suficiente evidencia científica para determinar el Requerimiento Promedio Estimado. Sirve para definir metas de ingesta para determinados nutrientes y para reducir el riesgo de deficiencias en la población. Es equivalente a “Adequate Intake”(AI) en inglés.

4.2.1.4 Límite Superior Tolerable de Ingesta (LSTI)

Es el nivel máximo de la ingesta total diaria y crónica de un nutriente proveniente de todas las fuentes, incluyendo alimentos, agua y suplementos nutricionales y que tiene la menor probabilidad de riesgo para que se produzcan efectos adversos para la salud en la mayoría de la población. Equivalente a “Tolerable Upper Intake Level” (UL) en inglés.

4.2.1.5 Máxima Ingesta en que no se observan efectos adversos

Corresponde a la dosis máxima sin efecto tóxico en la especie animal más sensible. Es equivalente a “No Observed Adverse Effect Level” (NOAEL) en inglés.

4.2.1.6 Mínima Ingesta en que se observan efectos adversos

Corresponde a la dosis de una sustancia o compuesto que en un estudio o en un grupo de estudios ha ocasionado efecto nocivo en la salud de las personas. Equivalente en

inglés a “Lowest observed adverse effect level” (LOAEL) (6,210,237).

4.3 Ingesta Dietética Recomendada para Folatos (IDR)

4.3.1 Equivalentes Dietarios de Folato(EDF)

El Requerimiento Medio Estimado (RME) y la Ingesta Dietética Recomendada (IDR) para folato, según el Instituto de Medicina de los Estados Unidos, utiliza como unidad los Equivalentes Dietarios de Folatos (EDF). Los EDF permiten convertir todas las formas de folato dietario incluyendo el ácido fólico en productos fortificados, en una cantidad equivalente al folato natural contenido en los alimentos.

Para la definición de EDF se estimó que los folatos naturales tenían una menor absorción (50%) debido a que la cadena de poliglutamatos lateral debía ser escindida y convertido a monoglutamato antes de la absorción(238), a diferencia del ácido fólico, cuya biodisponibilidad en ayuno se estimó cercana al 100% dado que corresponde a una forma monoglutámica (239). Como no existía una información segura de la biodisponibilidad cuando se consumía el ácido fólico con alimentos, se estimó una pérdida de alrededor de un 15% y una biodisponibilidad cercana al 85%(240). Como la estimación de la absorción de folatos naturales fue de 50% y la del ácido fólico 85%, se reconoce la imprecisión de esta equivalencia. De este modo, la equivalencia del ácido fólico en relación a los folatos naturales se estableció dividiendo 85/50 derivándose un resultado de 1.7 EDF (6).

Los EDF pueden ser expresados de diferentes maneras, dependiendo el tipo de conversión necesaria:

1 µg de EDF= 1 µg folato de los alimentos= 0,6 µg de ácido fólico proveniente de un alimento fortificado= 0.5 µg de ácido fólico de un suplemento consumido sin alimentos

1 µg de ácido fólico como fortificante= 1.7µg DFE

1 µg ácido fólico como suplemento en ayuda= 2µg DFE

4.3.2 Niños 0-11 meses

Como los datos eran insuficientes para establecer un RME en niños, no fue posible derivar una IDR a esta edad, se estimó una Ingesta Adecuada para dos grupos etáreos 0

a 5 meses y 6 a 11 meses, considerando el promedio de folatos ingerido por los niños desde la leche materna (6).

Ingesta adecuada = [volumen de leche consumido (0.78 Litro) x concentración de folato (85 µg folato/L) = 66 µg/día].

Los datos de los niños de 6 a 11 meses fueron extrapolados de los niños de 0 a 5 meses a través de una fórmula que consideró el incremento metabólico y que se correlacionó con valores derivados de estudios de ingesta (241).

4.3.3 Niños mayores del año y adolescentes

Tanto los RME y las IDR para las diferentes categorías de edad fueron extrapoladas de los valores de adultos a través de un método que asumía que las necesidades de folatos de los niños, en función del peso corporal (kg), eran igual que en los adultos. Se ajustaron los requerimientos por masa corporal y las diferencias metabólicas relacionadas con el peso corporal, utilizando un factor de 0.75. Además asumieron que no había diferencia de requerimientos entre hombres y mujeres hasta la edad de 14 años (6).

$$RME_{niños} = RME_{adulto}(F)$$

$$\text{donde } F = (\text{peso niño} / \text{peso adulto})^{0.75} (1 + \text{factor de crecimiento})$$

4.3.4 Adultos mayores de 19 años

Los datos fueron extraídos de diferentes estudios metabólicos controlados, estudios epidemiológicos, estudios clínicos de repleción de deficiencia de folatos, de reserva y excreción de folatos. En función de estos datos se estableció un RME de 320 µg EDF/día. Considerando que los datos eran insuficientes para derivar IDR para diferentes grupos de edad y sexo, se estableció solo una IDR para adultos ≥ 19 años asumiendo un coeficiente de variación de 1.2 para el RME (6).

$$IDR = (320 \mu\text{g} \times 1.2 = 384 \text{ que fue aproximado a } 400 \mu\text{g}).$$

4.3.5 Embarazadas

La recomendación en mujeres embarazadas se basó en estudios poblacionales y

metabólicos controlados. Las recomendaciones se basan en aquellos que mostraban la dosis que permitía mantener una concentración de folato del glóbulo rojo y que determinaba el menor riesgo para los defectos del tubo neural. Para calcular el RME se concluyó que la dieta mayor de 100 µg de ácido fólico (~200µg EDF/día) era inadecuada para mantener un nivel adecuado de folatos en embarazadas. El RME fue derivado agregando estos 200 µg al RME de las mujeres no embarazadas (320µg/EDF) determinando un RME de 520 µg/día. La IDR fue derivada aplicando un factor de 1.2 (6).

$$IDR = 520 * 1.2 = 600 \mu\text{g EDF/día}$$

4.3.6 Lactancia

El RME fue derivado en mujeres que amamantaban fue derivada de la ingesta necesaria de folato para reemplazar el folato secretado diariamente en la leche materna y la cantidad requerida para mantener un nivel adecuado en la mujer.

$$RME = [0.78 \text{ L (volumen de leche)} * 85 \mu\text{g/L (concentración de folato)} * 2 \text{ (factor de corrección de biodisponibilidad)}] = 133 \mu\text{g/día}.$$

Esta cantidad (133 µg/día) fue agregada al RME de mujer adulta no embarazada (320 µg/día). La IDR fue calculada usando un coeficiente de variación de 10% y aproximada a 500 µg/EDF/día.

4.3.7 Límite Superior Tolerable Ingesta (LSTI) para ácido fólico

Los estudios del comité concluyeron que no existían efectos adversos relacionados con los folatos contenidos naturalmente en los alimentos; por lo tanto, el LSTI se determinó sólo para el ácido fólico sintético.

Para fijar este máximo se consideró los potenciales efectos neurológicos adversos, especialmente, el desencadenamiento o exacerbación de neuropatía por déficit de vitamina B₁₂ y se basó en estudios que mostraban la ingestas más elevada sin efectos adversos observados (NOAEL) o el más bajo nivel donde se observaban efectos adversos (LOAEL). Los datos analizados sugerían que los pacientes con déficit de vitamina B₁₂, quienes recibían dosis de ácido fólico superiores a 5 mg/día en forma de suplementos, mostraban una progresión del daño neurológico. En esta revisión se

encontró que había solo 8 casos documentados con problemas neurológicos en los que consumían menos de 5mg/día de ácido fólico y sobre 100 casos cuando la ingesta excedía los 5 mg. La LOAEL fue definida entonces en 5 mg/día lo cual fue convertido a LSTI dividiéndolo por un factor de incertidumbre de 5 ($5/5=1$). El nivel de ingesta superior tolerable se definió entonces en 1 mg (1000 $\mu\text{g/día}$) para todos los adultos incluyendo las embarazadas. Esta cantidad no se convierte a EDF, sino que se refiere a ácido fólico consumido en adición a la dieta. Los LSTI para otras las edades fueron derivadas a partir del nivel definido para los adultos (241).

Tabla 4. Ingestas Dietarias de Referencia para folatos según Instituto Nacional de Medicina de los Estados Unidos*.

Grupo de Edad	IA*	EDF ($\mu\text{g/día}$)	Límite Superior Tolerable Ingesta de Ácido Fólico ($\mu\text{g/día}$)
	EDF($\mu\text{g/día}$)		
0-6 meses	65		No establecido
7-12 meses	80		No establecido
	RME**	IDR***	Límite Superior Tolerable Ingesta de Ácido Fólico ($\mu\text{g/día}$)
	EDF ($\mu\text{g/día}$)	EDF ($\mu\text{g/día}$)	
1-3 años	120	150	300
4-8	160	200	400
Niños y Niñas			
9-13 años	250	300	600
14-18 años	330	400	800
Hombres/ Mujeres			
19-30 años	320	400	1000
31-50 años	320	400	1000
>51 años	320	400	1000
Embarazadas			
14-18 años	520	600	800
19-30 años	520	600	1000
31-50 años	520	600	1000
Lactancia	450	500	1000

EDF=equivalentes dietarios de folatos, *IA = Ingesta adecuada (basada consumo folatos contenido en leche materna), **RME = requerimiento medio esperado, ***IDR= Ingesta Dietética Recomendada = Recommended Dietary Allowance.Fuente: Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline (1998) National Academy of

Sciences. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, 2008.

En la Tabla 5 se muestra la ingesta recomendada de folato para población española. Estas están expresadas en cantidades totales de folato día ($\mu\text{g}/\text{día}$). Para su obtención se utilizaron las metodologías de la Organización Mundial de la Salud, del Instituto de Medicina de los Estados Unidos y la Unión Europea (242).

Tabla 5. Ingesta Dietética de Referencia (IDR) de Ácido Fólico para población española.

Edad	Ácido Fólico ($\mu\text{g}/\text{día}$)
0-6 meses	60
7-12 meses	50
1-3 años	100
4-5 años	150
6-9 años	200
Varones	
10-13 años	250
14-19 años	300
20-29 años	300
30-39 años	300
40-49 años	300
50-59 años	300
60-69 años	300
>70 años	300
Mujeres	
10-13 años	250
14-19 años	300* ^o
20-29 años	300* ^o
30-39 años	300* ^o
40-49 años	300* ^o
50-59 años	300
60-69 años	300
>70 años	300
Embarazo	500* ^o †
Lactancia	400 ††

*Alemania, Austria y Suiza indican que las mujeres en estado preconcepcional deberían ingerir un suplemento adicional de 400 $\mu\text{g}/\text{día}$, un mínimo de 4 semanas antes del embarazo, para prevenir defectos en la formación del tubo neural del feto en caso de embarazo. Esta suplementación debe mantenerse el primer trimestre del embarazo.

^oLa Unión Europea ha visto que la ingesta de 400 µg/día de ácido fólico en forma de suplementos, en las etapas cercanas a la concepción, puede prevenir problemas en la formación del tubo neural en el niño.

[†]Se tiene en cuenta el valor de España (Tablas de Ortega et al., 2004) que es para la segunda mitad del embarazo.

^{††}Se tiene en cuenta el valor para Irlanda que es para los primeros 6 meses de lactancia.

Fuente: Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética. Ingesta Dietética de Referencia (IDR) para Población Española, 2010. Act Diet 2010;14(4):196-197.

5. Fortificación de alimentos para optimizar la salud

El acceso a una alimentación saludable y equilibrada que incorpore diariamente diferentes tipos de alimentos, en cantidades suficientes y adecuadas, es la mejor forma de prevenir la malnutrición, tanto de macronutrientes como de micronutrientes (243). Sin embargo, un acceso a alimentos en cantidad y calidad suficiente no siempre es posible, especialmente, en países en vías de desarrollo. También se observan deficiencias en países con un buen nivel de desarrollo económico, en poblaciones con alto consumo de alimentos ultraprocesados, caracterizados por presentar una alta densidad energética y un bajo contenido de micronutrientes, así como, en grupos poblacionales con requerimientos de nutrientes más elevados que no alcanzan a ser aportados por la alimentación diaria (244).

Numerosos factores económicos y sociales son determinantes de una alimentación con insuficiente aporte de energía y nutrientes, las que se asocian a una mayor morbilidad y mortalidad, especialmente en los grupos más vulnerables como son los niños, las embarazadas y los adultos mayores (245). Una limitada producción o acceso, un bajo poder adquisitivo asociado a precios elevados y una menor calidad nutricional de los alimentos disponibles derivados de algunos procesos industriales son factores determinantes en dietas desequilibradas, especialmente, en relación a vitaminas y minerales (246). A estos factores debe agregarse que las actividades destinadas a promoción en salud y educación nutricional no siempre se desarrollan adecuadamente, logrando sólo un limitado impacto en la modificación de hábitos y costumbres en los grupos considerados de mayor riesgo (247).

Existen diferentes tipos de intervenciones destinadas a mejorar la calidad de la dieta. Una de las aplicaciones más antiguas, es la restauración de nutrientes, que consiste en agregar nutrientes o micronutrientes esenciales a los alimentos para restaurar el nivel perdido inevitablemente durante el proceso de elaboración, cosecha o almacenamiento y que permite ofrecer un alimento con un contenido de nutrientes similar al contenido

antes del procesamiento. La suplementación es otra forma de aumentar el consumo de nutrientes en forma específica y rápida, especialmente de vitaminas y minerales. Estos suplementos aportan dosis elevadas de nutrientes por unidad de consumo, las que se entregan o se expenden envasados en diferentes formas de presentación como tabletas o jarabes, entre otras. El éxito de la suplementación dependerá de una adecuada distribución y provisión en las poblaciones intervenidas, así como, de un consumo diario regular y prolongado (248).

La fortificación de alimentos consiste en aumentar en forma deliberada el contenido de nutrientes, para mejorar el aporte nutricional del alimento y la salud de las poblaciones intervenidas con un mínimo riesgo para la salud (248). La fortificación de alimentos es una estrategia que fue utilizada por Suiza y Estados Unidos, durante los años 1922 y 1924 respectivamente (249), años en que se da inicio a la yodación de la sal y cuyo objetivo era prevenir el bocio endémico. La identificación de las vitaminas liposolubles que siguieron a la identificación del factor soluble en grasa (vitamina A) y posteriormente la caracterización de otras tres vitaminas liposolubles (vitaminas D, E y K), así como, la identificación y síntesis de vitaminas hidrosolubles, abrieron la puerta para la fortificación de alimentos a escala industrial, permitiendo tratar numerosas carencias vitamínicas que estaban presentes en la población, tales como la anemia por carencia de hierro, el bocio y el cretinismo derivados del déficit de yodo, y la ceguera secundaria al déficit de vitamina A, entre otras deficiencias(250).

5.1 Ventajas y Limitaciones de la Fortificación de Alimentos

Una de las ventajas de la fortificación de alimentos dice relación con su implementación, que no implica cambiar los hábitos de consumo de la población intervenida. Por esta razón, el alimento elegido para ser fortificado es crucial. Este debe corresponder a un producto alimentario de consumo diario, de amplia aceptación por la población, especialmente por las poblaciones con mayores carencias, no debe producir alteración sensorial, deber ser tecnológicamente factible de fortificar, y su consumo promedio diario debe entregar la cantidad suficiente del nutriente incorporado de acuerdo a lo establecido en el plan de fortificación (251).

El consumo regular de alimentos fortificados permite un depósito a nivel corporal más eficiente que un aporte intermitente de suplementos, limitando de esta forma, las

deficiencias asociadas a la estacionalidad, permitiendo cubrir de esta forma los mayores requerimientos, especialmente, en algunas etapas críticas de la vida, como son la infancia y el embarazo (248). La fortificación de alimentos es una intervención nutricional que puede permitir además, el aporte de varios nutrientes en forma simultánea, determinando que el coste final de la fortificación del alimento sea transferido al consumidor a un precio muy bajo.

Se ha descrito que el coste-efectividad de la fortificación es alta y dependerá de la estimación del micronutriente utilizado, del grado de deficiencia que se necesita prevenir, de la presencia de factores inhibidores en la dieta consumida, del país o zona donde ésta se desarrolle, así como, de la cobertura alcanzada (252). La fortificación es especialmente importante cuando el coste en salud derivado de la deficiencia es muy alto y el aumento del consumo del nutriente por parte del grupo objetivo, no es fácil de alcanzar, como es el caso del ácido fólico en las tres primeras semanas del embarazo. De este modo, la fortificación de alimentos ha sido considerada a nivel internacional una de las políticas sociales más rentables en materia de inversión social (253).

De acuerdo al Codex Alimentarius, se entiende por fortificación o enriquecimiento la adición de uno o más nutrientes esenciales a un alimento, tanto si está, como si no está contenido normalmente en el alimento, con el fin de prevenir o corregir una deficiencia demostrada de uno o más nutrientes en la población o en grupos específicos (254).

La fortificación de alimentos puede ser universal y mandataria, siendo en este caso, promovida por los gobiernos como una medida de salud pública y donde los productores del alimento a fortificar están obligados a cumplir en todo el país con el requerimiento establecido. Se pueden desarrollar también fortificaciones focalizadas en alimentos destinados a grupos específicos, como por ejemplo, alimentos entregados en escuelas o en situaciones de emergencia.

Una nueva estrategia consiste en una forma combinada de suplementación con fortificación conocida como suplementación alimenticia complementaria (255) que consiste en esparcir una mezcla de micronutrientes contenida en una bolsita sobre el alimento al momento de su preparación en el hogar (256). También se puede presentar en tabletas que se deshacen y mezclan fácilmente con cualquier alimento o bebida (257). Existen, además, fortificaciones voluntarias de nutrientes incorporadas por la

empresas de alimentos solo en algunos alimentos (258). Éstas corresponden más bien a objetivos comerciales y son desarrolladas sin recomendación de los gobiernos como una forma atraer la atención de los consumidores, incorporando diferentes mezclas de vitaminas, minerales u otros componentes con el objetivo de otorgarles un mayor valor comercial (259).

En este tipo de intervención nutricional se deben tener presente algunos aspectos que pueden constituir una limitación en la fortificación universal o mandataria de alimentos. Las diferencias en el consumo del alimento fortificado entre las diferentes personas es un factor a considerar, especialmente al interior de la familia, donde las preferencias personales o el menor consumo de algunos de los integrantes, por ejemplo niños, puede determinar una menor ingesta del nutriente fortificante (260,261). Otro aspecto a considerar se relaciona con un mayor consumo del alimento fortificado, superior a lo estimado, que puede determinar una exposición a niveles elevados del nutriente (262). Otras limitantes pueden tener relación con la naturaleza del alimento elegido para la fortificación, que por sus características, puede representar una restricción al agregado de fortificante, lo que hace necesario agregar una mayor cantidad del nutriente para mantener el efecto nutricional esperado y que resultará en un incremento del coste final del alimento. Por otra parte, la presencia del o de los nutrientes fortificantes pueden determinar una interacción con otros nutrientes que disminuya su biodisponibilidad o bien generar, en los niveles establecidos de fortificación, problemas sensoriales de olor, sabor y color que limite la aceptación por parte de la población (263).

Desde el punto de vista de los productores de alimentos, la fortificación universal puede ser vista con temor, debido al potencial aumento de coste derivado de la compra de equipos adicionales para cumplir la normativa, mantenimiento de equipos, así como, mayores requerimientos de personal entrenado y por la necesidad de desarrollar protocolos para control de calidad de la adición del nutriente. Además, este temor puede aumentar, si el alimento muestra algún cambio en sus propiedades sensoriales que afecten la percepción y la compra por parte de los consumidores (264).

El objetivo final de la fortificación universal o mandataria de alimentos es generar un aumento suficiente de un nutriente o de varios nutrientes en los alimentos seleccionados, que permitan complementar los requerimientos nutricionales de la

población intervenida. La masificación de la intervención hace necesaria, establecer regulaciones por parte de las autoridades sanitarias de los países, que permitan establecer adecuados estándares de identidad y desarrollar supervisiones periódicas, con el objetivo de asegurar que la cantidad definida de nutriente a incorporar se cumpla, limitando la exposición de la población a ingestas de nutrientes superiores al Límite Superior Tolerable de Ingesta (LSTI). Estudios desarrollados en numerosos países muestran un aumento en la ingesta de nutrientes proveniente de la fortificación, que alcanzan niveles superiores al 50% cuando se considera como referencia la etapa de pre-fortificación. Esta mayor ingesta puede ser atribuida a la acción combinada de políticas gubernamentales como es la fortificación universal y la implementada en forma independiente por la industria de alimentos, además del consumo adicional de suplementos de vitaminas como de minerales (265).

Numerosos son los países que han implementado diferentes tipos de fortificación de alimentos, especialmente con vitaminas y/o minerales, siendo aquellos con menor desarrollo económico quienes han obtenido logros significativos en salud (248), demostrando el efecto preventivo de la fortificación en las carencias de nutrientes para una buena parte de las poblaciones intervenidas (266-268).

El mayor desarrollo económico alcanzado en algunas regiones del mundo, especialmente en algunos países latinoamericanos, cuando se compara con las décadas pasadas, así como la globalización de los estilos de vida y la alimentación en general, han determinado importantes cambios en la población, generando no solo una mayor expectativa de vida, sino que también, un aumento en las enfermedades crónicas no transmisibles (269). Estos cambios en los patrones de alimentación, así como la comprensión de las bases bioquímicas y fisiológicas de los requerimientos nutricionales en la salud y enfermedad, han permitido conocer que no solo el déficit de nutrientes y micronutrientes representan un riesgo para la salud, sino que también, el exceso puede ser determinante en la aparición de daños (270-272). Considerando estos antecedentes y la existencia de diferentes requerimientos de nutrientes y micronutrientes en algunos subgrupos de población, se ha hecho necesario redefinir en algunas poblaciones, los nutrientes considerados como relevantes en la fortificación de alimentos debido a la aparición de otros déficit no considerados importantes en las primeras etapas de la fortificación, tales como, ácido fólico, vitamina B₁₂, selenio y calcio (273).

5.2 Fortificación de alimentos en Chile

Chile tiene una larga historia y experiencia en programas de fortificación de alimentos a nivel nacional, así como también en experiencias focalizadas dirigidas a algunos grupos de población. Estas han sido el resultado de la búsqueda de intervenciones de bajo costo y de alto impacto en la reducción de las carencias de micronutrientes, asociadas a una alta prevalencia de malnutrición, por déficits presentes en gran parte de la población durante la primera mitad del siglo XX (274).

A pesar del limitado desarrollo económico de Chile, el desarrollo de un modelo de salud basado en una planificación centralizada a través del Servicio Nacional de Salud en el año 1952, permitió implementar numerosos intervenciones y programas de carácter universal y con una amplia cobertura, orientados no sólo a dar atención en salud, sino también a desarrollar programas preventivos, tales como vacunación y entrega de alimentos, con especial énfasis en los grupos más vulnerables como son los niños y las embarazadas. Estas acciones, junto a medidas de saneamiento general, desarrollo de alcantarillado y entrega de agua potable permitieron reducir la desnutrición pluricarencial y la diarrea aguda, principales causas de muerte infantil en aquellos años, haciéndose más evidente algunas carencias específicas de nutrientes (275).

La fortificación de la harina de trigo a nivel nacional se inició el año 1952 con hierro (12 mg/kg), tiamina (6.3 mg /kg), riboflavina (1.3 mg/kg) y niacina (13 mg/kg). En un comienzo, se agregaba, además, calcio, pues la única premezcla disponible en esos años lo contenía. En el año 1961 el calcio fue retirado de la fortificación y se cambió, además, la forma de hierro fortificante, de sales de hierro a sulfato ferroso (30 mg/kg) como una forma de mejorar su biodisponibilidad. Es altamente probable que la fortificación de la harina de trigo con hierro haya influido en el mejoramiento del estado de nutrición de hierro de aquellos grupos étnicos de la población chilena que consume pan (276).

Numerosos proyectos fueron desarrollados posteriormente para mejorar la situación nutricional de hierro en lactantes y escolares, leches descremadas y enteras acidificadas con hierro, galletas con adición de hierro hemo y cereales extruídos. Todos ellos mostraron el impacto positivo en la reducción de anemia y de otros indicadores hematológicos de carencia de hierro (277-280). El persistente déficit de hierro en niños

menores de 2 años, impulsó en 1997 al Ministerio de Salud a fortificar la leche que se entrega en los establecimientos de atención primaria y que va destinada a los niños menores de 18 meses y a las embarazadas. Este producto aún se entrega y está fortificado con hierro (10 mg), zinc (5 mg), cobre (0.5 mg) y vitamina C (70 mg) por cada 100 gramos de producto en polvo (281). Los resultados de estas intervenciones se traducen en la actualidad en una menor prevalencia de anemia y en una mejoría en la talla y han permitido reducir la prevalencia de anemia en casi toda la población (282).

Otra importante medida de fortificación desarrollada en Chile corresponde a la yodación de la sal. Esta se inicia hace varias décadas llevando a la eliminación del bocio endémico como problema de salud pública en Chile. La primera legislación sobre yodación de la sal de consumo humano fue escrita en el año 1960 y establecida como obligatoria en el año 1979 (283,284). Posteriormente, debido a las altas concentraciones de yodo en orina de escolares detectadas desde 1991 en cuatro zonas censales, el año 2000 se decide reducir de 100 ppm a 40 ppm, con un rango de 20 a 60 ppm. Esta medida disminuyó las yodurias en las zonas censales, de una mediana de 1096 $\mu\text{g/L}$ en el año 2001 a 366.5 $\mu\text{g/L}$ en el 2003 (285,286).

Chile cuenta también con un programa de fluoración de agua potable, que beneficia alrededor de un 70% de la población y de leche para niños de escuelas rurales que no tienen acceso a fuentes de agua fluoradas. Esta fortificación representa una importante medida de salud pública para prevenir la caries dental desde hace más de cinco décadas y es reconocida por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) como uno de los 10 principales logros del siglo XX en salud pública. (287). Entre los aspectos más controvertidos de la fluoración se mencionan los aspectos éticos y sus potenciales efectos adversos en la salud, destacando el presunto riesgo de fracturas de cadera y cáncer (288,290).

El cambio en el perfil demográfico y epidemiológico experimentado en Chile ha determinado una mayor expectativa de vida de la población y un aumento en el número de los adultos mayores que ha hecho necesario la identificación de nuevas necesidades desde el punto de vista nutricional (291,292). La experiencia acumulada en materia de fortificación de alimentos en el país a través de los años ha permitido el desarrollo de nuevas intervenciones, que se focalizan en grupos específicos de población no

considerados con anterioridad, como embarazadas y adultos mayores.

Considerando que el embarazo y la lactancia constituyen una de las etapas de más alta vulnerabilidad nutricional, Chile ha desarrollado desde el año 2004, un programa de entrega de alimentos fortificados en base a una bebida láctea semidescremada adicionada con diez vitaminas, cuatro minerales y ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) (51).

Por otra parte, los adultos mayores, son beneficiarios desde el año 1999 de un programa de alimentación complementaria que entrega alimentos fortificados (crema en base a leguminosas y cereales y una bebida láctea deslactosada), ambos fortificados con vitaminas (A, D, E, C, B₁, B₂, Niacina, B₆, ácido fólico y B₁₂) y minerales (calcio, fósforo, magnesio, hierro y zinc).

5.3 Antecedentes de la fortificación de alimentos con ácido fólico

Una vez publicado los estudios que inequívocamente mostraban el efecto del consumo de ácido fólico en la prevención de los DTN (64-72), el Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos recomendó un consumo de 400 mg diarios en todas aquellas mujeres que presentaran antecedentes de haber tenido embarazos con hijos afectados por este tipo de malformaciones congénitas (293). Posteriormente, en el año 1992 el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos recomendó, como una forma de prevenir los DTN, que todas las mujeres en edad fértil deberían consumir 400 µg diarios de ácido fólico, ya sea a través de fortificación de alimentos o como suplementos vitamínicos (73). En el año 1998 el Instituto de Medicina de los Estados Unidos (IOM) reafirmó esta recomendación en adición al aporte de folatos de una dieta normal (210).

Omán fue el primer país en desarrollar una fortificación universal de harina de trigo con ácido fólico (1.5 mg/Kg) en el año 2006 (294). Esta iniciativa tuvo resultados a partir de ese mismo año, con el desarrollo de un estándar para harina enriquecida con ácido fólico (295). Esta medida fue implementada posteriormente en los Estados Unidos en forma universal a partir del año 1998 y durante el mismo año por Canadá (296).

De acuerdo a la organización Iniciativa para la Fortificación de Alimentos, en el año 2012, setenta y dos países establecían una fortificación universal de harina de trigo con

ácido fólico, de los cuales la gran mayoría lo establece en sus respectivas legislaciones. Otros, si bien no establecen un nivel de fortificación en el respectivo país, sólo utilizan harinas importadas fortificadas con ácido fólico (297).

En el año 2009, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en colaboración con la Organización para la Agricultura (FAO), el Fondo de la Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) y organizaciones que trabajan en la prevención y control de deficiencias de vitaminas y minerales, tales como la Alianza Global para Mejoramiento Nutrición (GAIN), la Iniciativa para Micronutrientes(MI) y la Iniciativa para la Fortificación de la Harina (FFI), desarrollaron un taller que permitió actualizar las recomendaciones para guiar técnicamente a los países en la implementación de la fortificación de alimentos a nivel nacional. En este documento se establecieron niveles promedios recomendados de ácido fólico para ser adicionados a la harina de trigo considerando la disponibilidad per cápita (g/día). Las recomendaciones de niveles oscilan entre 5 partes por millón (ppm) de ácido fólico para una disponibilidad de harina de trigo menor de 75 g/día, a 1 ppm en aquellos países con una disponibilidad superior a 300 g/día (298).

Tabla 6. Países con fortificación universal de harina de trigo con ácido fólico.

País	Nivel de Fortificación de Harina (µg/100 g)	País	Nivel de Fortificación de Harina (µg/100 g)	País	Nivel de Fortificación de Harina (µg/100 g)
Antigua	*	Fidji	*	Jordania	1.0
Arabia Saudita	1.5	Gana	2.1	Kazajistán	1.5
Argentina	2.2	Grenada	*	Kenia	0.5
Australia	2.5	Guatemala	1.8	Kosovo	1.0
Bahamas	*	Guinea	1.4	Kirguistán	1.5
Bahrain	1.5	Guyana	*	Kuwait	1.5
Barbados	*	Haití	*	Mali	2.6
Belice	1.8	Honduras	1.8	Mauritania	2.6
Benin	2.6	Indonesia	2	México	2.0
Bolivia	1.5	Irán	1.5	Marruecos	1.5
Brasil	1.5	Iraq	*	Moldavia	1.4
Canadá	1.5	Jamaica	*	Nepal	1.5
Camerún	2.6	Sierra Leona	*	Nicaragua	1.8
Chile	1.8	Solomon	2.0	Níger	2.6
Colombia	1.5	Sudáfrica	1.5	Nigeria	*
Costa Rica	1.8	Suriname	*	Omán	1.5
Costa de Marfil	2.6	Tanzania	1	Palestina	1.0
Cuba	1.8	Trinidad y Tobago	*	Panamá	1.8
Dominica	*	Togo	2.6	Paraguay	0.6
Dominicana	1.8	Turkmenistán	1.5	Perú	1.2
Ecuador	0.6	Uganda	3	San Cristóbal	*
Egipto	1.5	Uruguay	2.4	Saint Vincent	*
El Salvador	1.8	Uzkebistán	1.5	Santa Lucía	*
Estados Unidos	1.5	Yemen	1.6	Senegal	2.6

* Países que solo consumen e importan harina de trigo con ácido fólico Fuente: Global Progress. Food Fortification Initiative(FFI)

5.4 Fortificación de la harina de trigo con ácido fólico en Chile

Un estudio de carga de enfermedad en Chile publicado en el año 1996 permitió identificar los principales problemas de salud de la población a través del cálculo del indicador años de vida ajustados por discapacidad (AVADs) (299). Los resultados mostraron que la principal causa de pérdida de años de vida estaba dada por enfermedades no transmisibles, que representaban 73% de la carga. El segundo lugar lo ocupaban los traumatismos y sólo en último lugar estaban las enfermedades infecciosas, demostrando que el país presentaba las características de una transición epidemiológica avanzada (300). Este mayor peso de las enfermedades no transmisibles se evidenciaba también en los niños y en los grupos de edad avanzada, donde el 5.8 % de la mayor carga de enfermedad estaba dada por malformaciones congénitas del recién nacido, las que estaban incluso por sobre las causas cardiovasculares (299).

Considerando la evidencia científica disponible (67,68) que mostraba que una ingesta de ácido fólico cercana a los 400 µg/día durante el primer mes de embarazo, reducía en un tercio la frecuencia de niños con defectos del tubo neural (DTN) y el antecedente de la fortificación universal de harina de trigo con ácido fólico en Estados Unidos y Canadá (293, 296), el Ministerio de Salud de Chile desarrolla una serie de acciones tendientes a implementar la fortificación universal de harina de trigo con ácido fólico como el objetivo de prevenir las malformaciones congénitas del tubo neural en el recién nacido.

Dado que la harina de trigo en sus distintas formas de consumo, especialmente pan y fideos, constituía uno de los alimentos de consumo masivo, se estimó que éste era el alimento más adecuado para la fortificación con ácido fólico. Desde el punto de vista operacional, Chile tenía una larga trayectoria en fortificación de alimentos, por lo tanto, la incorporación de ácido fólico constituía una medida de salud pública complementaria a la fortificación existente (277-281).

El Ministerio de Salud de Chile constituyó, durante 1997, una comisión multisectorial con el fin de evaluar la factibilidad de implementar la fortificación de la harina de trigo con ácido fólico. Este grupo de trabajo estuvo constituido por representantes del sector académico, industriales y proveedores de vitaminas. Chile presentaba una alta prevalencia de DTN (17/10000 recién nacidos) y, además, un 10% de las primeras

consultas del Instituto Nacional de Rehabilitación Infantil correspondían a malformaciones congénitas. Dentro de las estimaciones desarrolladas, se estableció, que el coste de rehabilitación para cada niño era de US\$ 120000. Por otra parte, el coste estimado de la fortificación de la harina con ácido fólico era de alrededor de US\$ 175000 anuales, por lo que la prevención de un caso con malformación congénita permitía recuperar casi todo el coste de la fortificación, resultando de esta manera en una de las medidas en salud pública más altamente coste-efectivas (301).

Considerando que el consumo de pan en el hombre era de 380 g y en la mujer de 250 g, se estableció una fortificación de harina de trigo con 2.2 mg/Kg de ácido fólico, con el objetivo de lograr un consumo de ácido fólico de 400 µg/día. Esta medida quedó establecida como obligatoria a partir de enero del año 2000, en el artículo 350 del Reglamento Sanitario de Alimentos (Decreto 977/1996) (302).

Junto a esta normativa se estableció una norma para la implementación y vigilancia del proceso de fortificación en los molinos desarrollando las especificaciones técnicas y los correspondientes planes de inspección. Esta norma desarrollada durante el año 1999 definía la metodología analítica para la determinación de ácido fólico en harinas y pastas (303). La técnica permitía determinar folatos contenidos en harinas de trigo naturales y el ácido fólico agregado en las harinas fortificadas; estaba basada en un método de extracción trienzimática, seguido por cromatografía de afinidad y una identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (304). Se estableció, además, que la toma de muestras debía ser efectuada por los fiscalizadores de los Departamentos de Alimentos a lo largo de todo el país y enviadas al laboratorio de referencia, especialmente implementado para estos fines en el Instituto de Salud Pública. Se estableció que debía tomarse una muestra 250 g de harinas en cada molino del país cuatro veces en al año. La sobredosificación máxima permitida era hasta 3.2 mg/100g, es decir, un 35% por sobre el contenido máximo permitido de 2.4 mg/100 g.

Solo a partir del año 2005 el Instituto de Salud Pública dependiente del Ministerio de Salud apoyado por un proyecto desarrollado por el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile (INTA) comenzó a realizar los análisis correspondientes desarrollando una metodología diferente a la establecida en la norma.

La técnica utilizada y actualmente en ejecución (cromatografía líquida) permite determinar sólo el contenido de ácido fólico agregado en la harina de trigo (304).

Los resultados de los análisis de estas muestras son derivadas a los Departamentos de Alimentos de las Secretarías Ministeriales de Salud respectivas, quienes a su vez envían los análisis fuera de rango a los Departamentos Jurídicos correspondientes para efectuar los sumarios sanitarios y sancionar a quienes incumplan la normativa. También el Instituto de Salud Pública envía la información del contenido de fólico en harinas al Departamento de Nutrición y Alimentos del Ministerio de Salud para su evaluación y análisis.

Durante el año 2007 el Ministerio de Salud realizó un taller para evaluar el desarrollo de la fortificación de la harina de trigo con ácido fólico y otras vitaminas. Este taller contó con la participación de los representantes del área de nutrición del Ministerio de Salud, de los encargados de Departamento de Alimentos de la Secretaría Regional Ministerial de Salud Metropolitana, del Instituto de Salud Pública y del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. En ese taller se identificaron algunos de los problemas relacionados con la fortificación con ácido fólico, así como la gran variabilidad existente en los niveles de ácido fólico en las diferentes muestras de harinas. De esta reunión surgió como recomendación mejorar la premezcla de vitaminas que se agrega a la harina, controlar el proceso en los molinos, mejorar el sistema de muestreo y el proceso de análisis y corregir la reglamentación para poder optimizar el proceso. En Enero del año 2008 se desarrolló una nueva reunión denominada Taller de Fortificación de Harinas, con un especialista en el tema y participación de los empresarios molineros (305). En esta actividad se detallaron los problemas asociados a la fortificación de la harina en los molinos, los beneficios a nivel de salud de la fortificación de harina de trigo con ácido fólico y las nuevas evidencias en relación a su consumo excesivo. Como una forma de acotar los riesgos en aquellas personas que pudieran consumir una gran cantidad de pan, se estableció disminuir el aporte de ácido fólico en la mujer en edad fértil a niveles considerados efectivos para la prevención de DTN y continuar con una vigilancia de los casos de DTN para detectar cualquier cambio en el impacto.

Las principales conclusiones de este taller fueron desarrollar una nueva norma técnica para la premezcla de vitaminas que se agrega a la harina de trigo, disminuir el nivel de

fortificación de ácido fólico, desarrollar un sistema de monitoreo interno de los molinos a través de sistemas de aseguramiento de calidad, desarrollar controles de calidad, optimizar el monitoreo externo por parte del Ministerio de Salud a través de auditorías de desempeño y registros de las actividades de aseguramiento de calidad de los productores, mejorar la inspección a través de estándares, basados en ensayos cuantitativos y ensayos de corroboración y un cambio en la toma de muestras utilizando una toma de 3 muestras compuestas diarias, una compuesta de un lote almacenado (5 aleatorias), y otra del lote en producción (cada 30 minutos, hasta completar 5) y limitar la incorporación de ácido fólico sólo en las harinas como parte del programa de salud pública y no como fortificante de alimentos comerciales.

Las bases técnicas que dieron origen al nuevo niveles de fortificación (1.8 mg/100 g) fue calculado utilizando una fórmula que considera los kilos de pan per cápita consumidos en el Percentil 50 de hombres entre 19 y 50 años de edad. El programa ingresa el consumo de los otros grupos de población por edad y sexo considerándolas unidades equivalentes de energía ajustadas según los requerimientos de energía para adultos de acuerdo a lo establecido por la FAO (251). Para estimar el Percentil 5 de consumo y el Percentil 95 de consumo, el nivel promedio de consumo fue dividido por 3 y multiplicado por 2 respectivamente. Considerando que el Percentil 50 de consumo per cápita disponible de pan en hombres de 19 a 50 años era de 252.6 g, se estimó un consumo de 84.2 g para el Percentil 5 y de 505.3 g para el Percentil 95. Esta fórmula permite estimar, además, el consumo aproximado de pan para los otros grupos etáreos. Además de la cantidad consumida, el nuevo nivel de fortificación estimó las pérdidas de folato que se producen en el proceso productivo y durante la cocción (17%) así como el Límite Superior Tolerable de Ingesta (LSTI) y las Recomendaciones Diarias de folato (6).

5.5 Evaluación económica de la fortificación de harina de trigo con ácido fólico

Solo un limitado número de los países que fortifican harina de trigo con ácido fólico en forma universal cuentan con estudios que desarrollen una evaluación económica del impacto de la implementación de esta medida en la prevención de los defectos del tubo neural (DTN) (306-310).

Varios estudios desarrollados en Estados Unidos previo a la fortificación universal de alimentos proyectaban beneficios económicos y ahorro de costes si se lograba implementar esta medida (311-313). Un estudio de evaluación económica desarrollado por Grosse et al. (306) en la etapa post-fortificación evalúa el coste-beneficio y el coste-efectividad de esta medida y compara sus resultados con los obtenidos en los estudios previos. Los resultados muestran que los beneficios obtenidos con la fortificación son mayores que los estimados previamente debido al mayor número de casos de defectos del tubo neural, espina bífida y anencefalia evitados, al menor coste asociado por nacimiento, así como también, al menor coste en la implementación y ejecución de esta medida. El estudio muestra que los beneficios económicos obtenidos variaban entre US\$ 312 (US\$ dólares americanos) a US\$ 425 millones anuales, logrando un ahorro, como reducción neta de costes directos, entre US\$ 88 a US\$ 145 millones por año.

Bentley et al. (307) desarrollaron, posteriormente, una evaluación para medir el coste-efectividad de la fortificación con ácido fólico en Estados Unidos proyectando la carga de enfermedad y los costes asociados, así como, el cálculo de años ganados ajustados por calidad de vida (AVACs) que se obtenían con la prevención de los defectos del tubo neural, del infarto del miocardio y el cáncer de colon. A diferencia del estudio de Grosse et al. (306), ellos incorporaron, como costes, los derivados del enmascaramiento del déficit de vitamina B₁₂. Los autores proyectan cuatro escenarios: el primero sin fortificación y tres escenarios con distintos niveles de fortificación de ácido fólico (140; 350 y 700 µg/100 g de harina). El escenario de la no fortificación representa el consumo de folato observado durante la etapa anterior a la fortificación (≤ 200 µg/día). Los escenarios con fortificación representan consumos estimados de 201-300, 301-400 y >400 µg/día respectivamente. También se incluye un análisis según grupo étnico (blancos no hispanicos; negros no hispanicos y mexicanos). El análisis concluye que, en los tres escenarios de fortificación la proyección de la salud ajustando por grupo de edad, sexo y raza, muestra que los beneficios económicos ganados al prevenir los defectos del tubo neural, el infarto del miocardio y el cáncer de colon, exceden largamente los costes generados por la fortificación propiamente tales, así como por el incremento de complicaciones neurológicas derivadas del enmascaramiento del déficit de vitamina B₁₂. Los resultados predicen una mayor ganancia neta de años de vida ajustados por calidad de vida (AVACs) en los niveles más altos de fortificación,

observándose que los beneficios exceden los riesgos incluso en los grupos con una situación de salud más desfavorable. Considerando el escenario con el nivel más alto de fortificación (700 µg /100 g de ácido fólico), con un coste neto de US\$ 4365 millones por año, se ganan 322940 AVACs cuando se consideran todas las patologías incorporadas en el modelo, de los cuales 26889 corresponden a años ganados por prevención de defectos del tubo neural.

La evaluación de la fortificación de harina de trigo con ácido fólico en Chile publicada por Llanos et al. (308) desarrolla un análisis de coste-efectividad siguiendo la metodología proporcionada por el Proyecto de Control de Prioridades en el Control de Enfermedades avalado por la Organización Mundial de la Salud, el Banco Mundial y el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (314). Ésta metodología utiliza como medida los Años de Vida Ajustados por Discapacidad (AVADs) que resumen la mortalidad prematura y la morbilidad prevenida por la intervención evaluada. En este caso, se consideró como costes evitados los provenientes de la prevención de DTN (utilizando como referencia la incidencia en recién nacidos vivos y mortinatos >499 g) durante la etapa de pre-fortificación versus la incidencia de estos defectos en el segundo año de post-fortificación (año 2001). Como costes propiamente tales, se incluyeron los derivados de tratamientos médicos y de rehabilitación, más los derivados de adicionar ácido fólico a la harina, así como también, los derivados del sistema nacional de vigilancia del nivel de ácido fólico en harina. Los resultados, expresados en dólares internacionales (I\$), muestran un ahorro en los gastos en salud de I\$ 2,5 millones (aplicando una tasa de descuento del 3%), siendo el ahorro neto, de I\$ 2,3 millones después de descontar la inversión de la empresa molinera en la implementación de esta medida. Considerando la definición de la Comisión de Macroeconomía y Salud que define como intervenciones coste-efectivas aquellas con una relación tres veces menor que el producto interno bruto (PIB) *per capita* por AVADs y que el proyecto WHO-CHOICE clasifica como muy coste-efectivas las intervenciones con una relación menor que el promedio ingreso *per capita*, los autores concluyen que la fortificación con ácido fólico en Chile corresponde a una medida altamente coste-efectiva, considerando que durante el año de la evaluación de la fortificación, el Producto Interno Bruto *per capita* en Chile era de I\$ 11265 y el costo *per capita* por AVAD evitado producto de la fortificación fue de I\$ 75, es decir, menos del 1% del ingreso *per capita*.

La evaluación de implementación de la fortificación con harina de trigo en Sudáfrica también entrega resultados semejantes a las evaluaciones de Chile y Estados Unidos. Los autores desarrollaron una evaluación coste-beneficio comparando los costes directos de la fortificación versus los derivados de las mínimas intervenciones médicas necesarias para tratar los niños con defectos del tubo neural. El coste de tratamiento para cada niño fue estimada en US\$ 490000 el primer año de vida y un valor cercano a los US\$ 700000 cuando se consideraban los tres primeros años de vida. Los autores describen que la prevención de defectos de tubo neural por la fortificación de alimentos genera una relación coste-beneficio positiva (30/1) (309).

Diversos estudios han estimado el impacto hipotético de la fortificación de harina de trigo con ácido fólico en Australia y Nueva Zelandia, en relación a otras estrategias de intervención para promover el consumo de folato y ácido fólico tales como: el fomento de la educación nutricional, el consumo de un suplemento nutricional conteniendo ácido fólico o bien la inclusión de nuevas categorías de alimentos en la fortificación voluntaria (315,316). Rabovskaja et al. (310) compararon los costes y beneficios de la fortificación universal establecida a partir del año 2006 en la reducción de los defectos del tubo neural, tomando como referencia la fortificación y suplementación voluntaria de ácido fólico en el año 2005. Considerando el carácter universal de la intervención, los investigadores categorizaron toda la población en ocho grupos de edad. El cálculo de las prevalencias fueron ajustadas por embarazos terminados antes de la semana 20 de gestación como una forma de limitar la subestimación de casos. Este ajuste se realizó considerando un 60% de todos los embarazos con defectos del tubo neural en Australia son terminados antes de la semana 20. En este país el 20% de los embarazos afectados resultan en recién nacidos de los cuales solo un 17% sobrevive a los 28 días de vida. También se asume que todos los individuos mayores de 55 años con ingestas de ácido fólico superiores a 1mg/día podrían desarrollar problemas neurológicos derivados del enmascaramiento de la anemia por déficit de vitamina B₁₂. Los resultados muestran que la fortificación universal genera 539 Años de Vida Ganados (AVGs) y 503 años de vida ganados ajustados por calidad de vida (AVACs) que permite un ahorro de A\$ 10723 (A\$ dólares australianos) por cada año de vida ganada y de A\$ 11485 por cada año ganado en calidad de vida. En este estudio se analizó, también, la sensibilidad del modelo en diversos escenarios que no resultaron ser significativamente diferentes,

avalando de esta manera la decisión de fortificar en forma universal por parte de la autoridad sanitaria de ese país. La incorporación como variable de análisis de la pérdida de la capacidad de elegir de los consumidores, asumiendo que esta pérdida de selección estaba dada enteramente por la menor disponibilidad de pan sin fortificar muestra un aumento de los costes que determinarían la pérdida en la costo-efectividad de la intervención.

Aún cuando las metodologías utilizadas por las diferentes evaluaciones no son comparables, todas las evaluaciones costo-efectividad desarrolladas en la etapa post-fortificación concluyen que los beneficios logrados con esta medida exceden los costes asociados. Las limitaciones de estas evaluaciones derivan no sólo de la calidad y cantidad de datos disponibles en los países, sino que también de los beneficios y los efectos adversos en salud derivados de la fortificación que se incorporan a los modelos. Las diferencias dependerán también, de los costes de las enfermedades y de la implementación de la fortificación considerados en el análisis. En relación a los costes de tratamiento y rehabilitación de los defectos del tubo neural, se debe tener presente que existen nuevos tratamientos de rehabilitación y técnicas quirúrgicas que han mejorado la calidad y la expectativa de vida que deben ser considerados, las cuales determinarán importantes modificaciones en la relación costo-efectividad y costo-beneficio de la fortificación con ácido fólico. Los resultados de estos estudios de evaluación han sido fundamentales para que los ejecutores de políticas públicas puedan evaluar en forma integrada el impacto económico, en salud y calidad de vida de esta medida y fundamentar en los diferentes países la inversión económica que representa este tipo de intervención nutricional de carácter universal.

6. Análisis de Riesgo para Nutrientes

Una ingesta de vitaminas y minerales en cantidades adecuadas es esencial para mantener la salud y prevenir enfermedades. Su principal fuente es la dieta; sin embargo, existe la posibilidad de aumentar su ingesta a través de suplementos vitamínicos o a través de la fortificación de alimentos. Recientemente, se ha generado preocupación a nivel internacional por la aparición en el mercado de una gran oferta de alimentos fortificados. Esta preocupación estaría relacionada con la existencia de una mayor probabilidad de efectos adversos en la salud, en algunos grupos de población, cuando su

ingesta excede ciertas cantidades. Esto ha determinado un creciente interés por evaluar la existencia de efectos adversos asociados (317).

Se define como efecto adverso a cualquier deterioro de alguna función fisiológicamente importante o a un cambio en la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo a lo largo de la vida que resulta en una falla de su capacidad funcional o en la capacidad para compensar el estrés o en un aumento en la susceptibilidad a los efectos nocivos de otras influencias medioambientales (318). Por ello, la prevención de ingestas muy bajas o muy altas de vitaminas y otros nutrientes resulta imprescindible para mantener una salud adecuada.

Considerando la probable existencia de ingestas inadecuadas por parte de algunas subpoblaciones, el desarrollo de evaluaciones de riesgo tienen una gran importancia desde el punto de vista de la salud pública, porque contribuyen a identificar grupos en riesgo por ingesta deficitarias o excesivas de nutrientes que sobrepasan el límite superior tolerable de ingesta (LSTI) establecidos.

El análisis de riesgo es una metodología que permite evaluar los riesgos asociados a la presencia de peligros. Esta puede ser cualitativa o descriptiva y se desarrolla cuando los datos no son suficientes y el tiempo o los recursos son limitados. También puede ser cuantitativa cuando incorpora un análisis matemático de los datos numéricos efectuados en forma determinística (estimación puntual como mediana, percentil 95) o probabilística facilitando la adopción de decisiones en materia de gestión de riesgos, así como también, de su comunicación. Esta metodología se realiza desde hace muchos años, siendo establecida como tal el año 1983 para evaluación de tóxicos. Una de éstas corresponde a la propuesta del Comité de Evaluación de Riesgos y Peligros de Contaminantes de la Academia Americana de Ciencias de Estados Unidos (318).

El análisis de riesgo consta de tres fases o componentes integrados cuyo objetivo es determinar la naturaleza del riesgo, expresarlo en términos cualitativos o cuantitativos y establecer las medidas adecuadas para minimizarlo o limitarlo a un nivel aceptable. Estas etapas son similares a las propuestas para análisis de riesgos según otras metodologías y generalmente incluye tres etapas. La primera etapa consta de cuatro pasos. El primero corresponde a la identificación del peligro que incluye toda la recolección y evaluación de la información disponible del componente que pueda

perjudicar la salud. El segundo paso es la caracterización del peligro que evalúa los efectos nocivos en salud a través de la función dosis respuesta o bien, si esto no es posible, identificar la ingesta máxima en que no se observan efectos adversos o bien establecerla a través de la mínima ingesta en que se observan efectos adversos. Esta estimación suele asociarse a numerosas incertidumbres, para lo cual se deben utilizar algunos factores de corrección que permitan definir el LSTI. De este modo, mientras mayor es la incertidumbre menor es el LSTI. El tercer paso corresponde a la evaluación de la exposición, que en el caso de alimentos, corresponde a la ingestión probable que pueda producirse y que requiere conocer los hábitos de consumo y el cuarto paso corresponde a la caracterización del riesgo que estima la probabilidad que se produzca un efecto nocivo en una población determinada (319).

La segunda etapa de la evaluación de riesgo corresponde a la gestión de riesgos donde las autoridades, considerando la etapa anterior, pueden elegir las opciones más adecuadas para disminuir los riesgos, incluyendo medidas legislativas, así como también, dar seguimiento a las mismas. En esta fase se determina la importancia del riesgo estimado, se comparan los costos de su reducción frente a los beneficios sociales de correr dichos riesgos y se lleva adelante el proceso político e institucional para reducir dicho riesgo.

La tercera etapa de la evaluación de riesgo corresponde a la comunicación de riesgos. Este es un proceso interactivo de intercambio de información entre la evaluación, la gestión y el resto de las partes implicadas (319,320).

La evaluación de riesgo de micronutrientes en alimentos es algo diferente a las evaluaciones de otros componentes que pueden estar presentes en los alimentos. Los micronutrientes, vitaminas y minerales, corresponden a componentes biológicos esenciales, que tienen un impacto favorable en la salud a determinados niveles de ingesta y, a diferencia de otros componentes, puede tener impactos negativos en la salud cuando su consumo es insuficiente. Se ha observado también, que además de los síntomas característicos de la deficiencia clásica, muchos micronutrientes se asocian a riesgos diferentes dependiendo del efecto en salud (321). Un ejemplo es el caso de las enfermedades crónicas, donde los niveles necesarios de alcanzar para lograr esa reducción pueden ser más altos que los niveles definidos para prevenir una deficiencia

clásica. Por ejemplo, la prevención específica de los defectos del tubo neural, requiere que la mujer embarazada consuma 400 µg/día de ácido fólico adicionales a los folatos aportados por la dieta. Considerando que el límite superior de ingesta tolerable (LSIT) se fija de modo tal que incluso el individuo más sensible quede protegido, equilibrar los beneficios y riesgos es entonces, de una enorme importancia, especialmente para los ejecutores de políticas públicas (321).

En un inicio, la evaluación de beneficios y riesgo se hacía en forma separada (322). Actualmente y considerando que un mismo nutriente puede tener beneficios y riesgos, se propone el desarrollo de evaluaciones de riesgo integrada, que permitan que la información entregada corresponda a un balance entre los efectos beneficiosos en salud y los efectos desventajosos, describiendo finalmente cual es el efecto neto en salud (323,324).

La evaluación de beneficios y riesgos integrada en el área de alimentos es relativamente nueva y se basa en el reconocimiento de que una buena alimentación y la nutrición puede mejorar la salud y un cierto grado de riesgo puede ser aceptable si los beneficios descritos lo superan (325).

Considerando que muchas veces una evaluación de riesgo no es posible por falta de datos, se ha propuesto desarrollarla en forma escalonada utilizando los mismos pasos, pero deteniéndose en las diferentes etapas, dependiendo si la información recolectada es suficiente para dar respuesta a la pregunta inicial del análisis riesgo-beneficio (326). Las metodologías desarrolladas y conocidas por sus siglas en inglés “BRAFO” (Benefit-Risk Analysis for Foods) y “QALIBRA” (Quality of life integrated benefit and risk analysis) permiten desarrollar estudios de casos y ayudan a los responsables de la política pública a decidir cuándo detenerse o continuar con una evaluación (327,328).

En el modelo de evaluación BRAFO se establece una etapa de pre-evaluación que consiste en definir con claridad el alcance del problema que se quiere investigar y que no es parte de la evaluación de riesgos propiamente tal. Su objetivo es apoyar la toma de decisiones, por ejemplo, decidir la fortificación universal de un determinado alimento con un determinado nutriente. Por lo tanto, la cuestión del beneficio-riesgo es generalmente una opción entre políticas o cursos de acción alternativos, descritos en forma de escenarios (327).

Se entiende por escenario a la narración que describe una situación real o hipotética y es en este contexto que se hace referencia a las consecuencias de la ingesta de algunos alimentos o componente alimentario. De este modo, la evaluación beneficio-riesgo apoya la toma de decisiones caracterizando las diferencias en los resultados de salud para diferentes escenarios alternativos, generalmente un escenario de referencia y uno o varios escenarios alternativos. A veces, puede ser útil tener en cuenta, los riesgos y beneficios de solo un escenario, por lo general, de la situación actual, que evalúe la necesidad de reducir riesgos, así como las posibilidades de aumentarlos beneficios. Esto es equivalente a comparar la situación actual con un escenario nulo en el que el peligro y el beneficio del componente o nutriente es igual a cero. En este tipo de evaluación se debe identificar, no sólo el alimento o el nutriente a incorporar en la evaluación, sino también definir la población o las subpoblaciones a estudiar y la exposición de éstas al problema en estudio. La exposición debe considerar la estimación de la cantidad del nutriente proveniente de distintas fuentes e incorporar la función dosis-respuesta para los escenarios a analizar (327, 328).

El primer nivel de esta evaluación consiste en identificar las consecuencias potenciales para la salud, por ejemplo, de cambiar una intervención nutricional desde un escenario de referencia (alimento no fortificado), a un escenario alternativo (alimento fortificado). En esta etapa, los riesgos y beneficios deben evaluarse en forma independiente y, si la evaluación muestra que los riesgos son nulos o insignificantes o bien hay una identificación clara de un efecto en la salud, será suficiente para concluir cuál es el escenario que proporciona el mayor beneficio para la salud.

En el segundo nivel se desarrolla una integración cualitativa de los riesgos y beneficios que aparecen al analizar el cambio desde un escenario a otro o cuando los resultados de la primera etapa son inciertos y requieren ser evaluados. No basta con considerar solo la incidencia (número de personas afectadas) de los diferentes efectos en salud, porque algunos de ellos tienen un mayor impacto en la salud y en la calidad de vida que otros, sino que deben incluirse, además, la severidad de los efectos en salud expresados como, por ejemplo, el peso de la discapacidad, la duración o años vividos con el efecto y la mortalidad adicional causada por el efecto y los consiguientes años de vida perdidos. Esta etapa permite al evaluador identificar la dirección del cambio desde un escenario a otro, tanto para los beneficios como para los efectos adversos, los que pueden ser

evaluados cualitativamente. Esta etapa suele acompañarse de incertidumbres que deben ser identificadas y tabuladas, si aún así, la ventaja de un escenario sobre otro es clara, la evaluación puede concluir en esta etapa.

El tercer nivel debe desarrollarse solo cuando en los niveles previos se ha identificado beneficios y efectos adversos, pero ninguno de ellos es claramente dominante. La diferencia esencial entre el segundo y el tercer nivel está dada porque en el segundo nivel el balance de los efectos beneficiosos y adversos se realiza cualitativamente, mientras que en el tercer nivel se utiliza una medida cuantitativa. Se establece que los beneficios y riesgos sean medidos en una escala común, como por ejemplo, expectativa de vida, disposición para pagar para evitar un efecto adverso en salud, años de vida ajustados por discapacidad (AVADs) o años de vida ajustados por calidad (AVACs). Estos últimos combinan una serie de variables consideradas en los niveles anteriores como número de gente afectada o incidencia, severidad expresada como un peso y duración de la enfermedad y mortalidad (edad de muerte o enfermedad menos la edad de comienzo). Los AVAD/AVAC de la población son calculados sumándolos de todos los individuos de la población analizada. El mejor escenario es el que anota la mayor cantidad de AVAC o la menor de AVAD. La diferencia que se obtiene en el efecto neto de la salud entre la referencia y la hipótesis alternativa es el resultado de interés (327,328). Las variables necesarias para desarrollar estos cálculos no siempre son fáciles de obtener. Por ejemplo, el peso de algunas enfermedades puede ser encontrada en literatura de la OMS (329), sin embargo, el impacto de algunos nutrientes o componentes específicos de los alimentos en salud no siempre está suficientemente definidos, lo que supone desarrollar estimaciones con grandes incertidumbres asociados al desarrollo de pruebas de sensibilidad que investiguen la influencia de estas suposiciones en el resultado final. También la estimación de la mortalidad puede ser difícil porque muchas veces se debe obtener desde un estudio de experimentación en animales y proyectarlo a seres humanos, pudiendo haber causas crónicas que influyen en la mortalidad que han sido determinadas en etapas tempranas de la vida. La incidencia necesita ser estimada y para ello es preciso conocer la función dosis-respuesta que describe la relación entre la exposición al nutriente o alimento y la probabilidad de experimentar un efecto de salud. Una de las limitaciones de la función dosis-respuesta es que ésta se obtiene mayoritariamente de estudios en animales de

experimentación, para luego ser convertida en efectos sobre los seres humanos. Otra dificultad de la función dosis-respuesta es que se aplica, en general, a probabilidades para la vida y en este tipo de evaluaciones de beneficio-riesgo se requiere hacerlo de forma anual. Los riesgos pueden ser también estimados a partir de metaanálisis y, de ahí, ser convertidos en probabilidades absolutas de desarrollar la enfermedad. Si en este nivel se encuentra un beneficio o riesgo neto en algunos de los escenarios propuestos en relación al escenario de referencia, se puede detener la evaluación y seleccionar el escenario más adecuado.

En el cuarto nivel los riesgos y beneficios son otra vez integrados cuantitativamente usando AVADs o AVACs, adicionando métodos de distribución de probabilidades que permitan cuantificar la variabilidad y las incertidumbres derivadas de los distintos escenarios y estimar el efecto neto para cada uno de ellos (328).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

La información científica disponible en relación a folatos muestra el efecto beneficioso derivado de la fortificación universal de la harina de trigo con ácido fólico en la prevención de los defectos del tubo neural del recién nacido (306-309). También describe el rol benéfico de los folatos en algunas patologías tales como cáncer, especialmente cáncer de colon, cuando el ácido fólico es suplementado en etapas anteriores a la existencia de neoplasias (3), así como también en la prevención de la anemia macrocítica (96) y en algunas patologías cardiovasculares de tipo isquémico (163-165).

También existe una extensa información publicada durante los últimos años basados en diversos modelos de estudios en animales (125), así como en estudios clínicos que sugieren que el ácido fólico podría determinar un mayor riesgo para el desarrollo de algunos tipos de cáncer como, por ejemplo, cáncer de colon, cuando éste es consumido en altas dosis y por tiempo prolongado y cuando existen lesiones preneoplásicas previas (122). Algunos estudios también han sugerido un efecto protector de los folatos dietarios y un mayor riesgo en el cáncer de mama y próstata asociados a ácido fólico aunque los resultados son contradictorios (148,330,331). Estos resultados revelarían un efecto modulador dual del ácido fólico en la carcinogénesis que dependería del momento y de la dosis de intervención (332). Los niveles de ácido fólico que determinarían este mayor riesgo no están claramente establecidos. Sin embargo, numerosos estudios han mostrado la presencia de ácido fólico plasmático sin metabolizar cuando la ingesta sobrepasa 200 µg/día (34,190). Se ha especulado que la magnitud de la respuesta al consumo de ácido fólico y su aparición en la circulación podría estar relacionado con genes implicados en el metabolismo del folato, específicamente con dihidrofolato reductasa (DHFR) (34). Esto ha generado preocupación por una mayor probabilidad de riesgos asociados y ha planteado la necesidad de revisar o establecer nuevos niveles de ingestas recomendadas de folato (333). Estas consideraciones deben tenerse en cuenta, dado que el actual límite superior de ingesta tolerable establecido para folato, que es específico para el ácido fólico sintético, fue definido primariamente para evitar el enmascaramiento de la anemia y los problemas neurológicos asociados al retraso en el diagnóstico del déficit de vitamina B₁₂ y en una etapa donde no se contaba con suficientes datos disponibles para observar

otros efectos crónicos (6).

Destacan los hallazgos en algunos estudios recientes que describen la existencia de una mayor velocidad de deterioro cognitivo en el adulto mayor, que es más evidente en poblaciones evaluadas tras la fortificación de harinas, con niveles elevados y asociada a niveles séricos bajos de vitamina B₁₂, que demostraría la fuerte interrelación metabólica que existe entre estas vitaminas (116). Sin embargo, el nivel de seguridad de altas dosis de ácido fólico sigue siendo, en general, desconocida.

Uno de los aspectos relevantes de la fortificación de alimentos es la necesidad de contar con una evaluación integral, especialmente cuando existe una fortificación universal dado que este tipo de intervención nutricional compromete a toda la población y determina la ingesta de un nutriente por tiempo ilimitado.

En Chile la fortificación de la harina de trigo con ácido fólico, corresponde a una intervención nutricional universal y obligatoria que ha producido una importante reducción en la prevalencia de los DTN del recién nacido (308). Sin embargo, esta intervención representa un desafío desde el punto de vista de la salud pública, considerando que se interviene a grupos de población que no necesariamente se benefician con esta intervención y en la cual se han descrito no sólo beneficios, sino también eventuales riesgos en salud (4).

Tras doce años del inicio de la fortificación universal de la harina de trigo con ácido fólico en Chile, no existen estudios que evalúen en forma integral sus efectos sobre la salud de la población chilena, tanto de los beneficios como de los riesgos, siendo conveniente conocer en qué situación nos encontramos.

La hipótesis de este estudio es que la fortificación de harina de trigo con ácido fólico en Chile ha representado un importante beneficio para la reducción de la prevalencia de DTN del recién nacido; sin embargo, el largo tiempo de exposición a la fortificación en otros grupos de población podría haber determinado una mayor probabilidad de riesgos para la salud de los chilenos.

2. Objetivo General

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es conocer el impacto de la fortificación universal de la harina de trigo con ácido fólico sobre la salud de la población chilena.

3. Objetivos Específicos

El objetivo general se divide en los siguientes objetivos específicos:

- 3.1. Revisar en forma sistemática la información científica disponible en relación a beneficios y eventuales riesgos de la suplementación con ácido fólico.
- 3.2. Revisar en forma sistemática la información disponible en Chile sobre nivel de folato sérico pre y post-fortificación en distintos grupos de población.
- 3.3. Revisar y analizar los niveles de ácido fólico en la harina de trigo en la etapa de post-fortificación de harina de trigo.
- 3.4. Estimar, en forma indirecta, la ingesta de folatos totales en distintos grupos de población.
- 3.5. En base a la información disponible en Chile, describir los beneficios y los riesgos sobre la salud de la población chilena derivados de la fortificación de la harina de trigo con ácido fólico.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Planteamiento General

El análisis de los beneficios y riesgos de la fortificación de harina de trigo con ácido fólico en Chile corresponde a un estudio de casos desarrollado con el objetivo de conocer el impacto de esta intervención nutricional universal sobre la salud de la población chilena. De acuerdo con los objetivos planteados, este estudio se dividió en dos etapas:

1.1 Identificación de los beneficios y riesgos de la suplementación con ácido fólico

En esta etapa se desarrollaron diversas revisiones sistemáticas, con el objetivo de conocer el impacto de la suplementación de ácido fólico, así como también de la ingesta de folatos dietarios sobre algunos problemas de salud.

1.2 Análisis de los beneficios y riesgos de la fortificación con ácido fólico en Chile a nivel poblacional

En esta etapa se evaluó, en forma sistemática, la información disponible en Chile en relación al nivel de folato sérico durante la etapa pre y post-fortificación con ácido fólico y se estimó, en forma indirecta, el cambio en la ingesta de folato total en algunos grupos de población donde la información estaba disponible.

El cambio en la prevalencia de defectos del tubo neural del recién nacido fue analizada considerando la información disponible en el sistema de vigilancia chileno durante la etapa de pre-fortificación y post-fortificación.

Utilizando los datos disponibles de la Encuesta Nacional de Salud 2009-2010 (ENS 2009-2010) (334) se analizó el nivel de folato sérico y su relación con la función cognitiva de los adultos mayores chilenos considerando dos pruebas de evaluación cognitiva utilizadas en la Encuesta: el Mini-Examen del Estado Mental Modificado (MMMSE) y el Cuestionario de Actividad Funcional de Pfeffer (AFP).

2. Método

2.1 Identificación de los beneficios y riesgos de la suplementación con ácido fólico

Se desarrollaron las siguientes revisiones sistemáticas:

- Folato y riesgo de cáncer de mama
- Suplementación con ácido fólico y prevención de recurrencia de adenomas colorrectales.
- Folatos y otros nutrientes relacionados con la función cognitiva del adulto mayor.
- Evaluación de la eficacia de los programas de fortificación de folato en la prevención de malformaciones de nacimiento en diferentes países.

Todas ellas fueron desarrolladas cumpliendo las siguientes etapas (335,336):

- *Formulación e identificación del problema a investigar.*
- *Recolección de los estudios mediante la búsqueda bibliográfica en bases de datos.*
- *Especificación de los criterios de inclusión y exclusión.*
- *Selección y evaluación crítica de su calidad.*
- *Proceso de extracción de los datos y síntesis de los resultados.*
- *Elaboración de las conclusiones y recomendaciones.*

2.2 Análisis de los beneficios y riesgos de la fortificación con ácido fólico en Chile a nivel poblacional

2.2.1 Nivel de ácido fólico en harina de trigo

La información del nivel de ácido fólico contenida en harina de trigo fue obtenida del sistema de monitoreo que desarrolla el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) junto a los Departamentos de Alimentos de las Secretarías Regionales Ministeriales de Salud (SEREMIs). Esta información corresponde al nivel de ácido fólico (mg/100g) que se determina en muestras de harinas cuatro veces al año en los diferentes molinos del país.

El método analítico utilizado (cromatografía líquida) permite determinar la cantidad de ácido fólico agregado a los cereales (304). La información disponible fue entregada en planillas Excel y posteriormente categorizada en deciles, además de los percentiles 95 y 97.

2.2.2 Estimación de ingesta diaria de folato total

Para estimar la ingesta diaria de folato total, se aplicó la fórmula desarrollada por Quinlivan & Gregory (337,338) a los valores de folato sérico provenientes de diferentes estudios en población chilena desarrollados en la etapa pre y post-fortificación. Esta fórmula describe la relación entre folatos séricos y consumo de folatos.

$$y = 0.0145x + 0.132 \quad (r = -0,979; p < 0.0001)$$

siendo:

x = ingesta de ácido fólico

y = cambio o nivel de folatos séricos como equivalentes dietarios de folatos (EDF).

Esta fórmula fue aplicada a los folatos séricos, transformando nmol/L a µg/L utilizando un factor de conversión de 2.266 (6).

2.2.3 Prevalencia de Defectos del tubo neural en Chile (DTN)

La estimación de la prevalencia de DTN en Chile se efectuó a partir de la base de datos entregada en archivo Excel por el Departamento de Programas del Ministerio de Salud de Chile. Esta base contenía la información del sistema de vigilancia establecido en nueve hospitales de la capital de Chile, Santiago, a partir del año 1999 (etapa pre-fortificación) y hasta el año 2009 (etapa post-fortificación). Este registro prospectivo considera todos los recién nacidos, incluyendo nacidos vivos y mortinatos con un peso de nacimiento superior a 500 g proveniente de auditorías de muertes fetales y en niños menores de un año, fichas de alta de los hospitales, libros de registro de partos, registro de recién nacidos, autopsias y fichas clínicas. Se registraron todos los DTN asociados o no a otras malformaciones y por acuerdo se registró el DTN anatómicamente superior.

$$\text{Prevalencia} = [(\text{Número total de niños con DTN} / \text{Número total recién nacidos}) * 10.000]$$

El error estándar de la prevalencia anual de DTN para cada año fue calculado considerando las prevalencias anuales de cada hospital incluido en el sistema de vigilancia de malformaciones congénitas.

2.2.4 Beneficios y Riesgos de la Fortificación en Adultos mayores

Considerando que se describen beneficios y riesgos de los folatos en relación a función cognitiva del adulto mayor, se analizaron los datos proporcionados por ENS 2009-2010 (334). En este análisis también se consideraron los niveles séricos de vitamina B₁₂ dada la interrelación metabólica de ambas vitaminas. La base de datos fue proporcionada en una planilla Excel por el Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud.

2.2.4.1 Muestra

La muestra seleccionada para este estudio comprende todos los adultos mayores (65 y más años) participantes de la ENS 2009-2010 (334). Esta encuesta corresponde a un estudio de prevalencia realizado en hogares en una muestra nacional, probabilística, estratificada y multietápica de 5412 personas mayores de 15 años con representatividad nacional, urbana, rural y regional. Para cada individuo se consideró un factor de expansión correspondiente al inverso de la probabilidad de selección del individuo, lo que permite corregir los resultados muestrales considerando la probabilidad desigual de selección de cada entrevistado, dado el diseño muestral y la postestratificación demográfica según proyecciones censales a enero de 2010.

El grupo de adultos mayores en ENS 2009-2010 (1043 individuos) fue especialmente sobrerrepresentado en el muestreo, con doble probabilidad de selección en el hogar a través de la tabla de Kish con el objetivo de obtener resultados de precisión estadística similar a los otros grupos de población. De éstos, 827 disponían de valores para folato sérico y 817 para vitamina B₁₂. Los valores extremos (>62.5 µg/L para folato sérico y >1022 pmol/mL para vitamina B₁₂) fueron removidos para la descripción de los promedios y medianas nacionales (se excluyeron los valores 3 veces superiores o inferiores al rango intercuartil). Para el cálculo de las prevalencias no se excluyó ningún

valor.

2.2.4.2 Aspectos Éticos y Legales

El protocolo de la ENS 2009-2010 fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los participantes firmaron un consentimiento informado y sus resultados les fueron devueltos con recomendaciones y derivación según correspondía (334).

2.2.4.3 Laboratorio

Las muestras de sangre de participantes con ayuno nocturno previo fueron obtenidas por una enfermera entrenada. Tecnólogos médicos de los laboratorios regionales de la red de Servicios de Salud centrifugaron y alicuotaron las muestras biológicas recibidas según protocolo, almacenándolas congeladas a -20° C hasta su traslado a Santiago para su análisis centralizado en el Laboratorio Central de la Pontificia Universidad Católica, debiendo cumplir con los controles de calidad interno del laboratorio y lo establecido según acreditación de la Norma Chilena 2547 e ISO 15189 (339). El 91% de las muestras fueron procesadas antes de 4 horas desde el momento de la punción venosa, previo a lo cual fueron mantenidas refrigeradas a 4°C. Los niveles séricos de folato y vitamina B₁₂ fueron determinados mediante inmunoensayo competitivo por quimioluminiscencia directa (ADVIA Centaur®).

2.2.4.4 Variables independientes

- Nivel sérico de folato (µg/L).
- Nivel sérico de vitamina B₁₂ (pg/mL).

2.2.4.5 Variable dependiente

Función cognitiva

La evaluación de la función cognitiva fue desarrollada en el hogar del adulto mayor por una enfermera entrenada. En primer lugar se aplicó el Mini-Examen del Estado Mental Modificado (MMMSE) que evalúa aspectos de orientación, atención, memoria reciente y lenguaje, para lo cual se efectúan 6 preguntas con un máximo de 19 puntos (340,341).

Para identificar alteraciones cognitivas se utilizó como punto de corte ≤ 13 puntos (342,343). Como una forma de mejorar la identificación del deterioro de la función cognitiva, a los individuos con MMMSE alterado se les aplicó el Cuestionario de Actividad Funcional de Pfeffer (CAFP) (344). Éste consta de 11 preguntas que evalúan el estado funcional y el grado de dependencia diaria del adulto mayor, siendo contestado por un familiar o cuidador. Para esta prueba se consideró discapacidad para el desempeño de la vida cotidiana un puntaje ≥ 6 puntos.

2.2.4.6 Variables de control

Se consideraron las siguientes variables de control:

Edad: Los adultos mayores fueron categorizados en dos grupos:

- 65-74 años
- ≥ 75 años.

Sexo: Masculino y femenino.

Nivel educacional (NEDU): Se categorizó según el número de años de estudios: básico ≤ 8 años; medio entre 8 y 12 años; alto ≥ 12 años.

Zona de residencia (urbana o rural): Se utilizó la clasificación de zona urbana y rural de acuerdo a lo definido por el Instituto Nacional de Estadísticas de Chile (INE)(345).

Diabetes: Para la pesquisa de diabetes se incluyó sólo a los participantes con muestra de sangre y con un ayuno de al menos 8 horas. Para el análisis de glicemias como dato continuo, se excluyeron valores extremos superiores a 300 mg/dL. Se consideró como diabéticos a los sujetos con una glicemia de ayuno ≥ 126 mg/dL o con un autorreporte de diagnóstico médico de diabetes (346).

Hipertensión arterial: La medición de la presión arterial se realizó en una única visita matinal en ayunas, previo reposo de 5 minutos medidos por reloj y con un período de 2 minutos, también medidos exactos por reloj, entre cada una de las 3 mediciones efectuadas con un aparato automatizado previamente validado (OmronHEM 742[®]) (347). Para definir presión arterial elevada se utilizó el punto de corte $\geq 140/90$ mmHg, considerando las categorías establecidas por el Joint National Committee VI (347,348).

Se agregaron, además, aquellas personas normotensas que autorreportaron tratamiento farmacológico en el cuestionario previamente establecido para estos fines.

2.2.4.7 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se desarrolló en dos etapas:

Primera Etapa

La distribución percentilar considerando deciles y los percentiles (P) 5 y 95, así como los promedios de folato y vitamina B₁₂ sérico se analizaron según sexo y grupo de edad (65-74 años y ≥ 75 años). Los sujetos fueron categorizados en cuatro grupos según nivel de folato sérico ($\mu\text{g/L}$): ≤ 4.4 (déficit) (17); 4.41-20 (normal) y tres categorías de niveles definidos como suprafisiológicos considerando diferentes puntos de corte: 20.01-25.6 según Dary (186); 25.601-29 utilizado por Selhub et al. (115, 116) y $> 29 \mu\text{g/L}$ correspondiente al percentil 80 de la distribución de la muestra. Considerando el nivel sérico de vitamina B₁₂ (pg/mL) se establecieron 3 categorías: ≤ 200 (déficit); 200.01-299.5 (déficit marginal) y > 299.5 (normal) (349). Para efectos de ajuste, se consideraron los tres estratos definidos para nivel educacional (NEDU).

Las tasas de prevalencia y medias se calcularon utilizando los factores de expansión conforme al diseño complejo y ajustando la muestra a la demografía chilena a junio de 2010. Se calcularon Odds Ratio ajustados por edad y sexo utilizando regresión logística y, también modelos ANCOVA con intervalos de confianza 95%. En las tablas se muestran las prevalencias expandidas; sin embargo, los márgenes muestran el tamaño muestral del estrato. Para todos los análisis se utilizó el módulo de muestras complejas del programa estadístico SPSS v.21.0. El nivel de significación fue definido como $p < 0.05$.

Segunda Etapa

Para comparar adultos mayores con o sin deterioro de la función cognitiva se utilizaron las pruebas MMMSE y MMMSE más CAFP en forma secuencial. Se usó una prueba t de Student para las siguientes variables continuas: edad, folato y vitamina B₁₂ sérica. Para estudiar la asociación del deterioro cognitivo con las variables categóricas sexo, NEDU, zona, DM e hipertensión arterial se realizó un análisis de Chi-cuadrado.

Un análisis detallado de la asociación de riesgo de deterioro de la función cognitiva en adultos mayores con los niveles de folato sérico (FS), vitamina B₁₂ y las variables de control mencionadas se desarrolló mediante regresión logística múltiple. Se incluyeron además los cuadrados del nivel de folato sérico (FS²) considerando que niveles muy bajos o muy altos pueden constituir factores de riesgo (12). Se incorporaron las interacciones de FS y FS² con las variables de ajuste: edad, sexo, zona de residencia, NEDU, hipertensión arterial y diabetes mellitus, así como también, la interacción entre FS y vitamina B₁₂. Para edad se calculó el OR por cada 5 años de incremento, para FS por cada 1 µg/L de unidad de cambio y para vitamina B₁₂ por cada 10 pg/ml.

Las categorías de referencia establecidas para las variables categóricas fueron: para sexo, mujer; para NEDU, nivel educacional alto (>12 años estudio); para zona, región urbana y para DM e hipertensión arterial, la ausencia de enfermedad.

Considerando que en los modelos de regresión logística, cuando hay variables que aparecen en términos cuadráticos y/o en términos de interacciones, lo que la salida del programa SPSS denomina OR no es interpretable propiamente como tal, éstos fueron omitidos dado que lo relevante en este análisis es el riesgo de daño cognitivo que se produce cuando el nivel de dichas variables se modifica y donde el cambio en el nivel de ellas, también afecta a los términos cuadráticos y/o de interacción. Por ello, el cálculo del riesgo asociado a dichas variables incorpora las estimaciones asociadas a estas variables, sus términos cuadráticos y/o de interacción. A diferencia de los modelos usuales de regresión logística, cuando aparecen términos cuadráticos el OR de estas variables no es un único valor, sino que es un valor diferente para cada valor de dicha variable, mientras que al aparecer términos de interacción de dos variables en la regresión logística el OR de una variable depende de los valores de la otra variable. Considerando lo anterior y como no se puede resumir el OR a través de un único valor, se han dibujado figuras, describiendo además lo esencial de la variación de los OR en función de dichas variables.

La forma de la variación de las probabilidades de presentar daño cognitivo considerando ambas pruebas de evaluación (MMMSE y MMMSE más CAF) como función de los niveles de folatos en sujetos con diferentes perfiles de salud se presentan en dos figuras que permiten interpretar el riesgo de deterioro cognitivo que produce el

nivel de FS dado que FS y FS² no son variables independientes. Las probabilidades de deterioro de la función cognitiva se calculan a partir de los valores de los coeficientes de regresión logística.

Finalmente, para graficar el riesgo de deterioro de la función cognitiva según MMMSE mas CAFP asociado al aumento de folato sérico en una unidad ($\mu\text{g/L}$) para diferentes niveles de FS y vitamina B₁₂, se elaboró una figura bidimensional con tonos de grises. Esto permite distinguir los valores de FS y vitamina B₁₂ para los cuales un cambio en una unidad de FS produce un cambio significativo del riesgo de deterioro, así como también, los valores para los cuales no es significativo. Para determinar la significación de los OR para cada combinación de FS y vitamina B₁₂ se calculó el OR con su Intervalo de Confianza al 95% en base a los valores de los coeficientes, las varianzas de las estimaciones de dichos coeficientes y las covarianzas entre ellos. Este análisis se realizó utilizando el programa R for Windows, versión 3.0.1. Para todos los otros análisis de esta segunda etapa, se utilizó el módulo de muestras complejas del programa SPSS v. 17.0.0. El nivel de significación fue definido como $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Publicaciones

Manuscrito I

Castillo C, Tur JA, Uauy R.

Flour fortification with folic acid in Chile. Unintended consequences.

Rev Med Chil 2010;138(7):832-840.

Fortificación de la harina de trigo con ácido fólico en Chile. Consecuencias no intencionadas

Cecilia Castillo-L¹

Josep A. Tur²

Ricardo Uauy³

¹Pediatra. Master en Nutrición Humana y Calidad de los Alimentos. Universitat de les Illes Balears. Illes Balears. España.

²Grup de Recerca en Nutrició Comunitària i Estrès Oxidatiu Dpt. Biologia Fonamental i Ciències de la Salut. Universitat de les Illes Balears. Illes Balears. España.

³Unidad de Salud Pública y Nutrición, Laboratorio de Epidemiología Molecular. Instituto Nutrición y Tecnología en Alimentos, Universidad de Chile. Santiago de Chile.

Correspondencia a: Dra. Cecilia Castillo L. Clínica Avansalud Avda. Salvador 130 2º
Piso Providencia, Santiago. Fono 56-2-3662000-3662103
Correo: dracastillo@gmail.com

Recuento de Palabras 2722

Resumen: Ingestas diarias elevadas de ácido fólico (AF) podrían determinar riesgos en salud en algunas poblaciones. **Objetivos:** Revisar la fortificación de la harina de trigo con AF en Chile e identificar poblaciones en riesgo. **Material y método:** Se categorizó en percentiles (P) el nivel de AF en harinas (2005-2008). Se estimó ingesta diaria de AF (mg/d) en adultos por consumo aparente de pan según nivel de AF encontrado en harinas (P20, 50 y 95) y en niños (8-13 años) según nivel socioeconómico (NSE) y consumo pan (g/d) (P20, 50 y 75) considerando el nivel de fortificación normativo (2,2 mg AF/100 g). Se estimó consumo de EDF/d a partir de folatos séricos en adultos y ancianos (ambos sexos) considerando folatos sanguíneos (promedios y sus desviaciones estándar) y se calculó el porcentaje de población con ingestas sobre el requerimiento promedio estimado (EAR) y nivel máximo (UL) pre y post-fortificación. **Resultados:** Existe gran variabilidad de AF en harinas: 10-20% muestras sin AF, 10-30% con niveles >2,2 mg/100 g. Consumos de 2-4 panes/día en adultos determinarían ingestas AF cercanas al UL y también en niños (NSE bajo) con consumo de pan/día >P75. La estimación de ingesta de EDF/día en adultos y ancianos post-fortificación muestra que 99% de mujeres y 100% de hombres y ancianos tendrían ingestas >EAR y 2,3 % de mujeres y 6% de hombres tendrían ingestas alrededor UL. **Conclusiones:** Los niveles de AF (harina) y los niveles de folatos séricos encontrados post-fortificación muestran un aumento de su ingesta en algunas poblaciones que podría determinar mayor riesgo, sugiriendo una revisión del nivel de fortificación.

Palabra claves: folatos, ácido fólico, alimentos fortificados, evaluación de riesgos

Flour Fortification with folic acid in Chile. Unintended consequences.

Abstract

Background: High daily intake of folic acid (FA) could determine health risks in some populations. **Aim:** To review the Chilean AF wheat flour fortification and to identify the existence of populations at risk. **Material and methods:** We categorized the FA levels in flour samples (percentil, P) (2005-2008) and estimated intake of FA (mg/d) in adults from apparent bread consumption according to different levels (P20, 50 and 95) and children consumption (8-13 years) considering socioeconomic status (SES), bread/g/d intake (P20, 50 and 75) and regulated level of flour fortification (2.2 mg FA/100 g). Daily EDF consumption was estimated from serum folate in adults and elderly people (both sexes). We calculated the percentage of population with FA intakes over the estimated average requirement (EAR) and maximum level (UL) pre and post-fortification. **Results:** There is great variability in FA flour: 10-20% samples without AF and 10-30% with levels >2.2 mg/100 g. Adult daily consumption (2-4 day/loaves) could determine FA intakes close to UL. Children daily bread consumption (low socioeconomic level) >P75 have intakes close to UL. Post-fortification estimated daily EDF from serum folate in women, men and elderly people show: 99% of women, 100% of men and the elderly people have intakes higher than EAR. Additionally 2.3% of women and 6% of men would have intakes near the UL. **Conclusions:** The flour AF levels and serum folate levels in some populations show increased FA post-fortification intakes, which could lead to greater risk suggesting a revision of the fortification level.

Key words: folates, folic acid, fortified food, risk assessment

Antecedentes

En el año 1996 el Ministerio de Salud (MINSAL) de Chile desarrolló un estudio de carga enfermedad que mostraba que las malformaciones congénitas del recién nacido representaban un 5,85% de la carga total de enfermedad estimada, con altos costos asociados a su manejo, tratamiento y rehabilitación (1).

Durante 1997 el MINSAL invitó a diversos sectores sociales a evaluar la factibilidad de implementar la fortificación masiva de la harina de trigo con ácido fólico (AF) como una estrategia para prevenir los defectos del tubo neural (DTN) del recién nacido (RN). Estos alcanzaban a 16/10.000 nacidos vivos y representaban un porcentaje importante de las muertes infantiles (2) constituyendo cerca del 10% de las consultas del Instituto de Rehabilitación Infantil (3).

La fortificación de la harina de trigo se estableció como obligatoria a partir de enero de 2000 (2,0-2,4 mg de AF/kg) (3,4), siendo su principal objetivo aumentar la ingesta de folatos, especialmente en mujeres en edad fértil (400 mg/día) y reducir la prevalencia de los DTN (5-8).

La harina de trigo fue seleccionada como vehículo para el AF porque el pan es un alimento de consumo diario en Chile (9) y su adición no altera las características organolépticas del pan y derivados (4). Esta intervención ha sido altamente costo-efectiva determinando una importante reducción de los DTN a través de los años (40%) (10,11).

Sin embargo, la existencia de una mayor oferta de alimentos fortificados ha generado preocupación a nivel internacional y un creciente interés por evaluar la existencia de riesgos asociados a su exceso en grupos que no se benefician con esta intervención(12).

Estudios recientes muestran que una suplementación con ácido fólico efectuada antes del desarrollo de una neoplasia suprimiría su desarrollo y progresión pero favorecería su desarrollo cuando ésta existe (13-19). El cáncer de colon, así como el cáncer de mama y próstata, podrían relacionarse con ingestas elevadas de folatos, especialmente, como ácido fólico. Se describen además anemia y alteraciones neurológicas en ancianos con ingestas elevadas de folatos (16-17).

La mayor ingesta de ácido fólico se produciría por niveles de fortificación superiores a

lo establecido y por mayor consumo de alimentos fortificados y/o suplementos nutricionales (20) que determinarían una mayor probabilidad de exceder la Ingesta Máxima Tolerable o “Upper Level”(UL) (12, 21,22).

Considerando estos antecedentes, en este estudio se analiza la fortificación de la harina de trigo con ácido fólico en Chile, con el objetivo de conocer la existencia de poblaciones en riesgo por ingestas excesivas de dicho nutriente.

Material y Método

a.- Fuente de Datos

La información sobre niveles de AF en harina se solicitó a la Autoridad Sanitaria: Departamento de Nutrición y Alimentos, Secretarías Regionales Ministeriales (SEREMIs) y al Instituto de Salud Pública (ISP) a través del portal Chile Transparente, vía e-mail y/o telefónicamente a los jefes de sección. La información del contenido de AF en muestras de harinas fue entregada por el ISP en un CD conteniendo archivos en planillas Excel (2005-2008). La información de normas y seminarios fue entregada en documentos Word y Power Point por el Departamento de Nutrición y Alimentos. Los antecedentes de niveles de folatos sanguíneos se recopiló de artículos chilenos y de información obtenida de algunos talleres efectuados en el MINSAL (23-26). El consumo de pan estimado en niños fue extraído de una publicación nacional (27).

b.-Análisis de Datos

La información sobre contenido de AF en harina fue categorizada en percentiles. Se estableció como población en riesgo aquellas con ingestas diarias de AF cercanas al UL (600 mg/d/niños y 1000 mg/d/adultos) (21). Se calculó la ingesta de AF proveniente del consumo aparente de pan, considerando un contenido de AF en harinas según valores de los percentiles (P) 20, 50 y 95 de cada distribución anual. Para cálculos, se consideró un pan promedio de 100 gramos conteniendo 87 gramos de harina. El aporte de AF proveniente de otros alimentos no fue incluido en el análisis.

En población infantil se estimó ingesta de AF considerando el nivel promedio establecido en la norma de harinas (2,2 mg/kg) y el consumo de pan en gramos/día proveniente de una encuesta alimentaria efectuada en la Región Metropolitana, con datos estratificados por nivel socioeconómico (NSE), grupo de edad (8-9, 10-11 y 12-13

años), y percentiles de consumo (P25, 50 y 75) (25).

Se aplicó la fórmula desarrollada por Quinlivan & Gregory para determinar la ingesta total de folatos pre y post-fortificación considerando valores de folatos sanguíneos (28,29). Esta fórmula describe la relación entre folatos séricos y consumo de folatos ($y=0,0145x+0,132$ $r=-0,979$ $p < 0,0001$), siendo x = ingesta de ácido fólico e y = cambio o nivel de folatos séricos como Equivalentes Dietarios de Folatos (EDF). Esta fórmula fue aplicada a los folatos sanguíneos provenientes de estudios chilenos transformando nmol/L a mg/L a través de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g/L} = \frac{\text{nmol/L}}{2,266}$$

Los valores promedio y la desviación estándar de la ingesta diaria de EDF obtenidos al aplicar la fórmula fueron utilizados para estimar el porcentaje de población con mayor riesgo en el período pre-fortificación y post-fortificación. Para efecto de cálculos, se asumió una distribución Gaussiana normal de los requerimientos de folatos (30). A partir de valores de ingesta de EDF y considerando los valores z de la distribución, se estimó el porcentaje de las poblaciones con mayor probabilidad de tener ingestas superiores al Requerimiento Promedio Estimado (EAR) para folatos (320 $\mu\text{g/día}$) e ingestas cercanas al UL (21). Como la ingesta de folatos naturales no es equivalente al ácido fólico y considerando que el UL está definido para AF, éste fue convertido en EDF utilizando un factor de conversión de 1,7 ($\text{EDF}=1000 \mu\text{g} \times 1,7$) (16).

Resultados

En la Tabla 1 se observa que la mediana del contenido de AF en harinas varía de 1,9 mg/kg en el año 2005 a 1,5 mg/kg en 2007. Estos niveles representan entre un 13,6 y 31% menos que lo establecido en la norma chilena. Durante los años 2005, 2006 y 2007 no se detecta AF en cerca del 10% de las muestras. Por otra parte, alrededor del 30% tienen contenidos elevados ($>2,5$ mg/kg). En el año 2008 la mediana de AF en harinas fue 50% menor a lo establecido (1,1 mg/kg) y más baja que los años anteriores. En este último año 20% de las muestras no contienen AF y 10% contiene niveles elevados ($>2,6$ mg/kg).

La ingesta estimada de AF proveniente del consumo aparente de pan aplicando los

niveles de fortificación encontrados en harinas y considerando los percentiles 20, 50 y 95 se muestran en la Tabla 2. Se observa que entre los años 2005 a 2007, un consumo de 2 a 3 panes diarios elaborados con harinas con niveles de AF sobre el P95 permitirían alcanzar ingestas superiores al UL. Durante el año 2008 y en correspondencia con el menor contenido de AF en harinas, el UL se alcanzaría con mayores consumos de pan.

En la Figura 1 se presenta una estimación de la ingesta de AF en niños entre 8 y 13 años según NSE considerando sólo consumo de pan (gramos/día) según P 20,50 y 75 y asumiendo que la harina utilizada cumple con el nivel de fortificación establecido (2,2 mg /kg). Se observa que los niños de nivel socioeconómico bajo, con consumos diarios de pan sobre P75 podrían tener ingestas cercanas al UL (600 µg/día) (21).

Las ingestas promedio de Equivalentes Dietarios de Folatos (EDF) y sus desviaciones estándar en distintos grupos de población fueron estimadas a partir de la ecuación de Quinlivan & Gregory (28,29) y comparadas con el EAR y el UL establecidos para folatos (Tabla 3). Durante la pre-fortificación, sólo 42,7% de las mujeres tenía ingestas superiores al EAR, aumentando a 99% en el período post-fortificación, con ingestas promedio 3,5 veces superior al EAR y donde 2,3% tenía ingestas cercanas al UL. Los datos del estudio de ancianos (24), permiten estimar que 82% presentaba ingesta de EDF superiores al EAR. En este mismo grupo se observa un aumento durante la etapa post-fortificación, encontrándose que el 100% tenía ingestas superiores al EAR. Considerando los valores de folatos séricos de un estudio desarrollado con posterioridad (año 2008) (25), se puede observar que la ingesta de EDF estimada en hombres adultos era 3,2 veces superior al EAR y donde el 6% tenía ingestas superiores al UL.

En la Figura 2A se representa un modelo para estimar riesgo por exceso de folatos asumiendo una distribución Gaussiana del requerimiento.

En la Figura 2B se utilizan los valores estimados de EDF en mujeres presentado en la Tabla 3, para mostrar en forma gráfica, el aumento de la ingesta de folatos derivado de la fortificación de la harina. En esta figura se puede observar el desplazamiento de la curva de ingesta hacia la derecha, mostrando el porcentaje de la población con ingestas superiores al UL (2,3%).

Discusión

Los folatos cumplen funciones en la metilación biológica y en la síntesis de ácidos nucleicos que explican sus beneficios, pero también sus probables riesgos (21). Los folatos de los alimentos difieren de la estructura química del AF utilizado en la fortificación de alimentos, lo cual determina una metabolización diferente (20). Algunos estudios sugieren que la reducción enzimática y la metilación del AF durante la absorción en el intestino es dosis dependiente, saturándose los mecanismos normales de absorción sobre 200-266 $\mu\text{g}/\text{día}$ y determinando la presencia de AF sin metabolizar en el suero que aumentaría cuando las dosis se repiten (31,32). El mayor riesgo en salud dependería no sólo de su nivel de ingesta, sino también, de la extensión en el tiempo de su consumo. Esto ha determinado que países como Gran Bretaña posterguen la fortificación (33).

El objetivo de este estudio ha sido evaluar el caso de la fortificación de la harina de trigo con AF en Chile y la existencia de poblaciones en riesgos por ingestas excesivas de folatos. Para esto se ha analizado el contenido de AF en muestras de harina que procesa el sistema nacional de vigilancia chileno. En general, se observa una gran variabilidad del contenido de AF, con 10-20% de harinas sin AF, por otra parte se encuentra un 10-30% de muestras con niveles superiores a la norma. Esto puede generarse por una granulometría inadecuada de la mezcla vitamínica que limita la homogeneización, por un mezclador inadecuado y/o por el tiempo de mezclado. Los niveles elevados pueden corresponder también a una sobredosificación para asegurar el cumplimiento del mínimo establecido, sugiriendo la existencia de dificultades para asegurar la calidad del producto. Otros factores a considerar es el método de toma de muestras y de análisis, aún cuando la técnica ha sido adecuadamente validada (34). Los niveles de AF durante el año 2008, con una mediana de 1,1 mg/kg, representan un valor 50% más bajo que lo normado y observado en años anteriores. Esto podría corresponder a una adecuación efectuada por la industria siguiendo recomendaciones entregadas en seminarios técnicos del MINSAL (24). Sin embargo, la caída de la mediana en un 50% sugiere la existencia de dificultades fabriles que debieran ser corregidas.

Un aspecto a analizar es la oportunidad (35) en que se estableció el monitoreo de la

fortificación en Chile. Esto ocurrió cuatro años después de iniciada la fortificación (año 2005), situación que no ha permitido conocer los niveles de AF durante los primeros años (2000-2004), limitando la identificación de riesgos y retrasando adecuaciones y/o modificaciones. Sin embargo, la fortificación con AF en Chile se considera una intervención exitosa que cumplió con los objetivos planteados, reducir la prevalencia de RN con DTN, mostrando que aunque no se conocían los valores en harinas durante los primeros años, la fortificación se estaba desarrollando. Datos de 9 hospitales de Santiago muestran el descenso en el número de casos con DTN (18 a 7,4/10.000 nacimientos en 1999 y 2006 respectivamente) (26). Se ha descrito recientemente que el déficit de vitamina B₁₂ sería un factor determinante de algún porcentaje de los DTN (36), mostrando que una reevaluación y ajuste en los niveles de AF es posible, lo cual permitiría mantener la protección en niños, pero limitando riesgos por exceso en otros grupos.

Como la dosis, el tiempo y el momento de la suplementación (13-15) son factores que determinan riesgos, se ha descrito que dependiendo del nivel de ingesta se establecería una curva de riesgos en forma de U, donde bajas dosis contribuirían al desarrollo de cáncer de colon, mientras que altas dosis (1mg AF/día) e ingestas prolongadas (>3 años) contribuiría a mayores riesgos en portadores de lesiones neoplásicas incipientes (37). Al parecer, el cáncer sobrerregularía los receptores de folatos para responder a las necesidades aumentadas de nucleótidos necesarios para la síntesis de ADN (38). Por otra parte, los beneficios de una mayor ingesta para prevenir cáncer de colon se describen en sujetos sanos, consumidores de alcohol y portadores del polimorfismo C677T en su variedad TT (39,40).

Algunos estudios describen también un riesgo 5 veces mayor para deterioro neurológico y cognitivo en ancianos asociado a niveles elevados de folatos sanguíneos (>59 nmol/L) y bajos niveles de vitamina B₁₂ (<148pmol/L), demostrando la interrelación del metabolismo de los folatos con otras vitaminas (16,17). Estos hallazgos sugieren la necesidad de contar probablemente, con UL diferenciados por grupo de edad y condición genética, entre otras variables, consideraciones que podrían dificultar el establecimiento de niveles adecuados y límites seguros de AF para fortificaciones masivas.

Los datos de este estudio muestran que la ingesta de AF en adultos, estimada a través de consumo aparente de pan, podría determinar la existencia de grupos con una mayor probabilidad de riesgos por ingestas cercanas al UL. La estimación de ingesta de fólico provenientes de consumo de pan en niños de menores recursos muestra que aquellos con mayores consumos y considerando niveles de fólico en harina según la norma chilena podrían tener ingestas excesivas, situación que debiera verificarse en futuros estudios.

Estas estimaciones tienen sus limitaciones porque fueron realizadas considerando sólo consumo aparente de pan, aún cuando en Chile existe un consumo frecuente de otros productos fortificados preparados con harina de trigo (41) pudiendo esperarse ingestas superiores. El consumo de folatos y ácido fólico deben ser evaluados considerando la gran variabilidad del contenido de AF en harinas (Tabla 1) para limitar eventuales riesgos.

La ecuación propuesta por Quinlivan & Gregory si bien corresponde a una forma indirecta para establecer consumo de folatos y no reemplaza la determinación del consumo por encuestas y/o de medición de indicadores bioquímicos, resulta ser una herramienta útil para estimar la ingesta de EDF diarios y los riesgos por déficit y/o exceso a partir de valores de folatos séricos (28,29). Esta corresponde a una regresión lineal, aún cuando es esperable una curva de saturación, se basó en estudios que reportaban consumo de folatos y niveles séricos, validados con encuestas de consumo, con una alta correlación, siendo utilizada en otros estudios para estimar ingesta de folatos (42). En este estudio se estima que el 85% de ancianos durante la pre-fortificación presentaban niveles de folatos sanguíneos sobre el EAR, niveles que podrían relacionarse con el AF aportado por un alimento fortificado del Programa Nacional de Alimentación del Adulto Mayor (43). En mujeres, donde no existía entrega de alimentos fortificados, sólo un 42% presentaba ingestas superiores al EAR justificando la necesidad de la intervención.

Las Figuras 2A y B muestran en forma gráfica el cambio en la ingesta de folatos después de la fortificación, destacando que ya en los primeros años de fortificación (datos del año 2003) un 2,6% de mujeres presentaba ingestas superiores al UL.

Otra limitación se genera por los niveles de folatos sanguíneos utilizados en el análisis

que corresponden preferentemente a valores de los primeros años de fortificación. Considerando que el consumo de harina fortificada ha sido permanente y que un porcentaje presenta de ella presenta niveles de fortificación sobre lo establecido, los actuales valores de folatos séricos debieran ser más altos, aumentando la probabilidad de riesgos, como muestran los datos de folatos séricos en hombres (año 2008) que permiten estimar ingestas promedio de 1044 EDF/día (Tabla 3).

Los resultados de este estudio muestran la necesidad de realizar una evaluación de riesgos integrada de esta intervención nutricional en Chile, considerando los beneficios y los riesgos. Esto permitiría adecuar el nivel de fortificación en harinas considerando que existe un porcentaje de mujeres, niños y adultos con ingestas de ácido fólico cercanas al UL. El principio de beneficencia implicaría tomar las mejores medidas para optimizar los beneficios pero minimizando los riesgos (42), reduciendo la sobreexposición innecesaria en algunos grupos, pero asegurando los beneficios en embarazadas.

Referencias

1. GOBIERNO DE CHILE. MINISTERIO DE SALUD. La carga de enfermedad en Chile 1996. Disponible en: <http://epi.minsal.cl/epi/html/sdesalud/carga/Inffin-carga-enf.pdf> [Consultado el 15 diciembre de 2009].
2. NAZER JH, ARAVENA TC, CIFUENTES LO. Malformaciones congénitas en Chile. Un problema emergente (período 1995-1999). Rev Med Chile 2001; (129):895-904
3. GOBIERNO DE CHILE. MINISTERIO DE SALUD. Norma Técnica para la Fortificación de la Harina de trigo con Vitaminas y Minerales. Diciembre de 1999.
4. GOBIERNO DE CHILE. MINISTERIO DE SALUD. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Disponible en: http://www.redsalud.gov.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_alimentos/reglamento_sanitario_alimentos.html [Consultado el 25 de julio de 2009].
5. SMITHELLS RW, SHEPPARD S, SCHORAH CJ, SELLER MJ, NEVIN NC, HARRIS R et al. Apparent prevention of neural tube defects by periconceptual vitamin supplementation. Arch Dis Child 1981;56(12):911-8.
6. LAURENCE KM, JAMES N, MILLER MH, TENNANT GB, CAMPBELL H. Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. Br Med J (Clin Res Ed) 1981;282(6275):1509-11.
7. WERLER MM, SHAPIRO S, MITCHELL AA. Periconceptual folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. JAMA 1993;269(10):1257-61.
8. SHAW GM, SCHAFFER D, VELIE EM, MORLAND K, HARRIS JA. Periconceptual vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. Epidemiology 1995;6(3):219-26.
9. ESPINOSA F. SISVAN de alimentos Índices. Consumo de alimentos y cambios de hábitos alimentarios. INTA. Universidad de Chile. Santiago:1998
10. HERTRAMPF E, CORTÉS F. National food-fortification program with folic acid in Chile. Food Nutr Bull. 2008 Jun;29(2 Suppl):S231-7.
11. LLANOS A, HERTRAMPF E, CORTES F, PARDO A, GROSSE SD, UAUY R.

- Cost-effectiveness of a folic acid fortification program in Chile. *Health Policy* 2007;83(2-3):295-303.
12. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO-WHO). A Model for Establishing Upper Levels of Intake for Nutrients and Related Substances Report of a Joint FAO/WHO Technical Workshop on Nutrient Risk Assessment. WHO Headquarters, Geneva, Switzerland 2-6 May 2005.
 13. KIM YI Folate and colorectal cancer: An evidence-base critical review. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51(3):267-92.
 14. VAN GUELPEN B, HULTDIN J, JOHANSSON I, HALLMANS G, STENLING R, RIBOLI E, et al. Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut* 2006;55(10):1387-9.
 15. SANJOAQUIN MA, ALLEN N, COUTO E, RODDAM AW, KEY TJ. Folate intake and colorectal cancer risk: A meta-analytical approach, *Int. J. Cancer* 2005; 113: 825–828.
 16. SELHUB J, MORRIS MS, JACQUES PF, ROSENBERG IH. Folate-vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. *Am J Clin Nutr* 2009;89(2):702S.
 17. MILLER JW, GARROD MG, ALLEN LH, HAAN MN, GREEN R. Metabolic evidence of vitamin B-12 deficiency, including high homocysteine and methylmalonic acid and low holotranscobalamin, is more pronounced in older adults with elevated plasma folate. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(6):1586-92
 18. STOLZENBERG-SOLOMON RZ, CHANG SC, LEITZMANN MF, JOHNSON KA, JOHNSON C, BUYS SS et al. Folate intake, alcohol use, and postmenopausal breast cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Am J Clin Nutr.* 2006;83 (4): 895-904.
 19. FIGUEIREDO JC, GRAU MV, HAILE RW, SANDLER RS, SUMMERS RW, BRESALIER RS, et al. Folic acid and risk of prostate cancer: results from a randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(6):432-5. 2009
 20. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) Final Rule. Food Standards:

- Amendment of Standards of Identity for Enriched Grain Products to Require Addition of Folic Acid. Federal Register 61:8781-8797.(1996).
21. NATIONAL RESEARCH COUNCIL(NRC). Recommended Dietary Allowances. 10th ed. Washington, DC: National Academy Press, 1989.
 22. SHAKUR YA, ROGENSTEIN C, HARTMAN-CRAVEN B, TARASUK V, O'CONNOR DL. How much folate is in Canadian fortified products 10 years after mandated fortification? Can J Public Health. 2009;100(4):281-4.
 23. HERTRAMPF E, CORTÉS F, ERICKSON JD, CAYAZZO M, FREIRE W, BAILEY LB, et al. Consumption of folic acid-fortified bread improves folate status in women of reproductive age in Chile. J Nutr 2003;133(10):3166-9.
 24. HIRSCH S, DE LA MAZA P, BARRERA G, GATTÁS V, PETERMANN M, BUNOUT D. The Chilean flour folic acid fortification program reduces serum homocysteine levels and masks vitamin B-12 deficiency in elderly people. J Nutr 2002;132(2):289-91.
 25. HIRSCH S, RONCO AM, GUERRERO-BOSAGNA C, DE LA MAZA MP, LEIVA L, BARRERA G, et al. Methylation status in healthy subjects with normal and high serum folate concentration. Nutrition. 2008; 24(11-12):1103-9
 26. GOBIERNO DE CHILE. MINISTERIO DE SALUD. Seminario de Fortificación de Harinas. Enero de 2008. Disponible en: http://www.redsalud.gov.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_alimentos/prot_fortificacion.html [Consultado el 14 de diciembre de 2009].
 27. OLIVARES S, BUSTOS N, LERA L, ZELADA ME. Estado nutricional, consumo de alimentos y actividad física en escolares mujeres de diferente nivel socioeconómico de Santiago de Chile. Rev Med Chile 2007; 135: 71-78.
 28. QUINLIVAN EP, GREGORY JF 3rd. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. Am J Clin Nutr 2003;77(1):221-5.
 29. QUINLIVAN EP, GREGORY JF 3rd. Reassessing folic acid consumption patterns in the United States (1999 2004): potential effect on neural tube defects and overexposure to folate. Am J Clin Nutr 2007;86(6):1773-9.

30. UAUY-DAGACH R, HERTRAMPF E. Food-based dietary recommendations: possibilities and limitations. In: Bowman B, Russell R, eds. Present knowledge in nutrition, 8th ed. Washington DC: ILSI Press, 2001:636–649.
31. SWEENEY MR, MCPARTLIN J, SCOTT J. Folic acid fortification and public health: report on threshold doses above which unmetabolised folic acid appear in serum. *BMC Public Health* 2007;7:41
32. SWEENEY MR, MCPARTLIN J, WEIR DG, DALY L, SCOTT JM. Postprandial serum folic acid response to multiple doses of folic acid in fortified bread. *Br J Nutr.* 2006;95(1):145-51.
33. STANDING ADVISORY COMMITTEE ON NUTRITION. Folate and disease prevention. London, United Kingdom: The Stationary Office, 2006. Disponible en: http://www.sacn.gov.uk/reports_position_statements/reports/report_on_folate_and_disease_prevention.html[Consultado el 1 de junio de 2010] .
34. GOBIERNO DE CHILE. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA. Programa de Fortificación de Harinas. Disponible en: <http://www.ispch.cl/programa-de-fortificacion-de-harinas>[Consultado el 1 de junio de 2010] .
35. ALLEN L, BENOIST B, DARY O, HURRELL R. Guidelines on food fortification with micronutrients. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations 2006.
36. LI F, WATKINS D, ROSENBLATT DS. Vitamin B(12) and birth defects. *Mol Genet Metab* 2009;98(1-2):166-72.
37. COLE BF, BARON JA, SANDLER RS, HAILE RW, AHNEN DJ, BRESALIER RS, et al. Polyp Prevention Study Group. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA* 2007;297(21):2351-9
38. MASON JB. Folate, cancer risk, and the Greek god, Proteus: a tale of two chameleons. *Nutrition Reviews* 2009; 67(4):206–212
39. BAILEY LB. Folate, methyl-related nutrients, alcohol, and the MTHFR 677C-->T polymorphism affect cancer risk: intake recommendations. *J Nutr* 2003;133(11 Suppl 1):3748S-3753S.

40. KIM Y.I. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and pharmacogenetics: A new role of single nucleotide polymorphisms in the folate metabolic pathway in human health and disease. *Nutr Rev* 2005;63(11):398-407
41. MUÑOZ O, BASTIAS JM, ARAYA M, MORALES A, ORELLANA C, REBOLLEDO R et al. Estimation of the dietary intake of cadmium, lead, mercury, and arsenic by the population of Santiago (Chile) using a Total Diet Study. *Food Chem Toxicol.* 2005;43(11):1647-55.
42. DARY O. Establishing safe and potentially efficacious fortification contents for folic acid and vitamin B12. *Food Nutr Bull* 2008;29(2 Suppl):S214-24.
43. GOBIERNO DE CHILE. MINISTERIO DE SALUD. Programa de Alimentación Complementaria del Adulto Mayor. PACAM. Disponible en: http://www.redsalud.gov.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_alimentos/prot_pan.html [Consultado el 23 diciembre de 2009].

Tabla 1. Contenido de ácido fólico (mg/kg) en harina de trigo según percentiles (P)
Chile 2005 – 2008

Año	n	P10	P20	P30	P40	P50	P60	P70	P80	P90	P95	P97
2005	338	0	0,59	1,21	1,51	1,9	2,2	2,5*	3*	4,3*	5,9*	7,4*
2006	391	0,2	0,65	1,01	1,36	1,61	1,99	2,4*	3,06*	5,03*	9,8*	15,9*
2007	279	0,1	0,58	0,99	1,27	1,51	1,77	2,3*	2,8*	4,8*	8,6*	10,1*
2008	243	0	0	0,3	0,68	1,1	1,5	1,8	2	2,6*	3,2*	3,7*

Fuente: Calculado a partir de la base de datos proporcionada por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

* Valores sobre la norma chilena de fortificación de harina de trigo con ácido fólico (2,2 mg/kg)

Tabla 2. Estimación de ingesta de ácido fólico AF ($\mu\text{g}/\text{día}$) en adultos según consumo aparente de pan y distintos niveles de fortificación de harinas

	Año 2005			Año 2006			Año 2007			Año 2008*	
Percentiles	P20	P50	P95	P20	P50	P95	P20	P50	P95	P50	P95
A. Fólico Harina											
($\mu\text{g}/100\text{g}$)	60	190	590	70	160	980	58	151	860	110	320
A. Fólico Pan											
($\mu\text{g}/100\text{g}$)	52	165	513	61	139	853	50	131	748	96	278
1 pan	52	165	513	61	139	853	50	131	748	96	278
2 panes	104	331	1027	122	278	1705	101	263	1496	191	557
3 panes	157	496	1540	183	418	2558	151	394	2245	287	835
4 panes	209	661	2053	244	557	3410	202	525	2993	383	1114
5 panes	261	827	2567	305	696	4263	252	657	3741	479	1392

*Año 2008 P20 = 0

Valores con negrita= Ingestas estimadas de AF ($\mu\text{g}/\text{día}$) superiores al UL (1000 μg)

Tabla 3. Estimación de ingesta de Equivalentes Dietarios de Folatos ($\mu\text{g}/\text{día}$) y de poblaciones con ingestas sobre Requerimiento Promedio Estimado y Nivel Máximo Recomendado (%).

Grupos Estudiados	Nivel de	Ingesta		
	Folatos Séricos Promedio ($\mu\text{g}/\text{L}$)	Promedio EDF* ($\mu\text{g}/\text{día}$)	Población (%) Ingestas > EAR*	Población (%) Ingestas > UL*
Mujeres				
Prefortificación**	4,3	286,1	42	0
Mujeres				
Postfortificación***	16,4	1123,1	99,7	2,3
Adultos Mayores.				
Prefortificación^o	7,1	483,9	81,6	0
Adultos Mayores				
Postfortificación^o	14,4	986,1	100	0
Hombres Adultos				
Postfortificación^{oo}	15,3	1043,9	97	6

* Equivalente Dietario de Folato=EDF; Requerimiento Promedio Estimado=EAR;

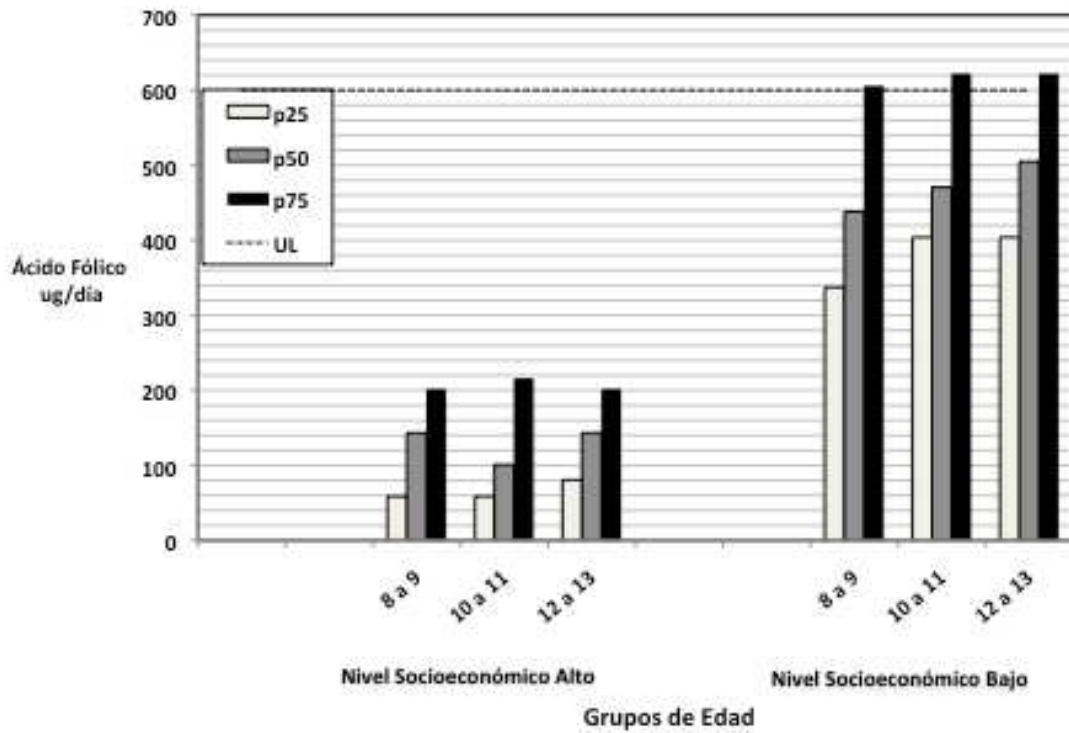
Nivel Máximo Estimado=UL

** Hertrampf E, 2003 (15, 19)

*** Hertrampf E, 2003 (15, 19)

^o Hirsch S, 2001 (17, 20)

^{oo} Hirsh S, 2005 (18)



*Considerando 87 gramos de harina en 100 gramos de pan y 220 µg/AF en 100 gramos harina

Figura 1. Consumo aparente de ácido fólico (µg/día)* en niños de nivel socioeconómico alto y bajo según grupos de edad y percentiles de consumo de pan (gramos/día)

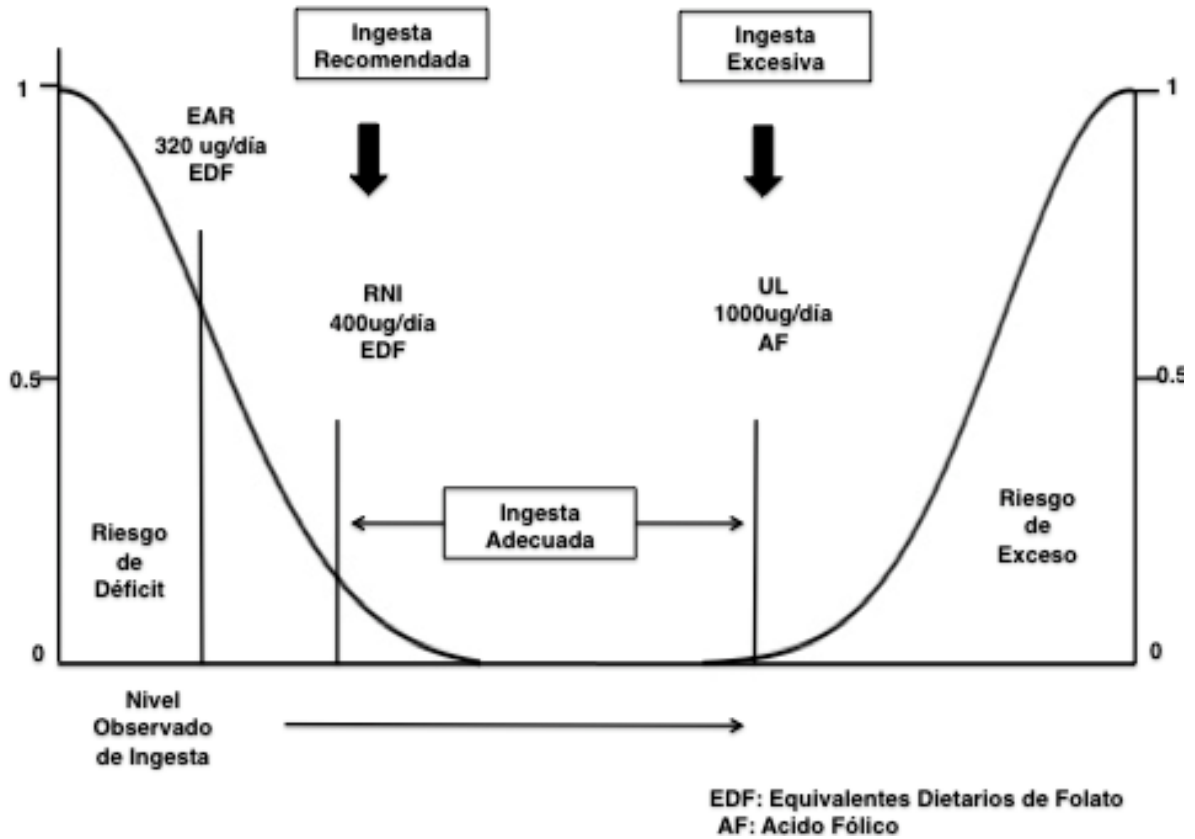


Figura 2 A. Modelo para estimar la ingesta de folatos ($\mu\text{g}/\text{día}$) asumiendo una distribución Gaussiana del Requerimiento

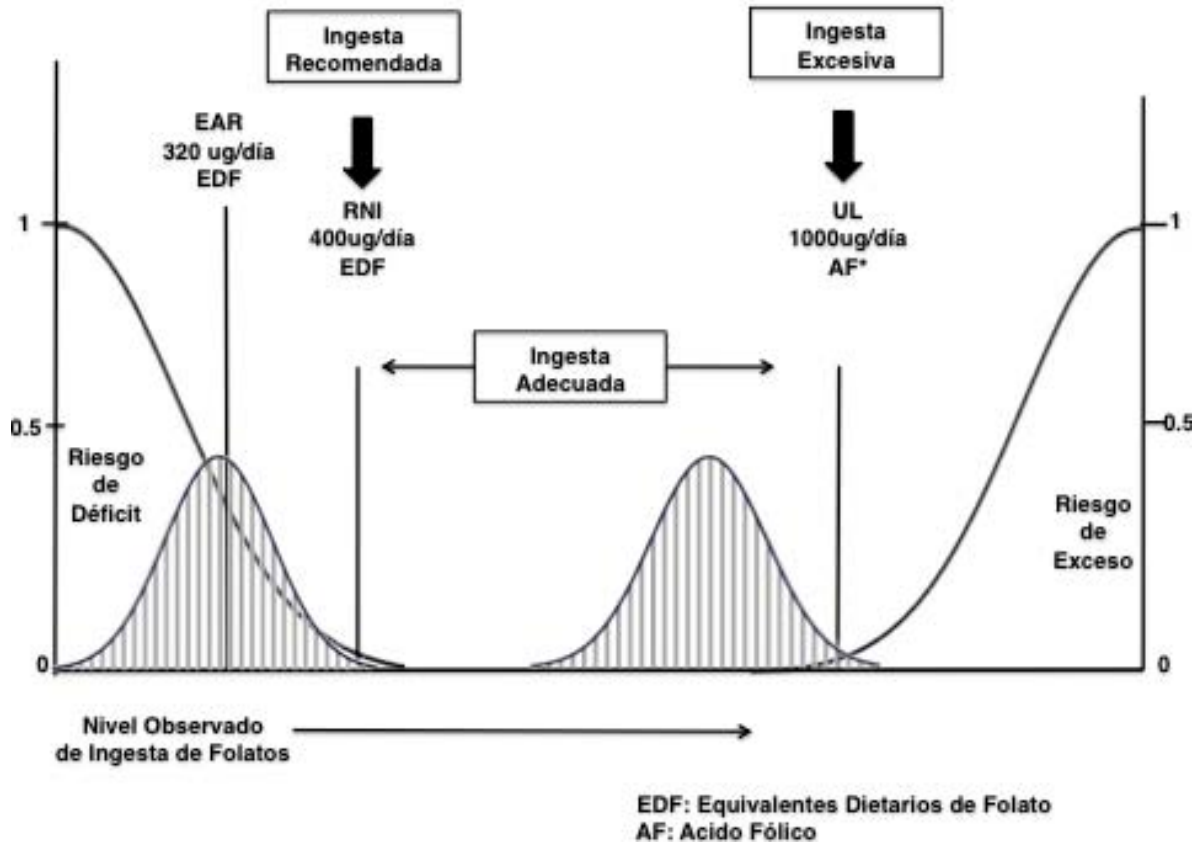


Figura 2 B. Efecto de la fortificación de la harina de trigo con ácido fólico en la ingesta de folatos en un grupo de mujeres (edad fértil).

Manuscrito II

Castillo C, Tur JA, Uauy R.

Folatos y riesgo de cáncer de mama. Revisión sistemática.

Rev Med Chil 2012;140(2):251-260.

-

Folatos y Riesgo de Cáncer de Mama: Revisión Sistemática

Cecilia Castillo-L¹

Josep A. Tur¹

Ricardo Uauy²

¹Grup de Recerca en Nutrició Comunitària i Estrès Oxidatiu Dpt. Biologia Fonamental i Ciències de la Salut. Universitat de les Illes Balears. Illes Balears. España.

²Unidad de Salud Pública y Nutrición, Laboratorio de Epidemiología Molecular. Instituto Nutrición y Tecnología en Alimentos, Universidad de Chile. Santiago de Chile.

Correspondencia a: Dra. Cecilia Castillo L. Clínica Avansalud Avda. Salvador 100 2º
Piso Providencia, Santiago. Fono 56-2-3662000
Correo: dracastillo@gmail.com

Rcto de Palabras: 2932

-

Resumen: Un aumento en la ingesta de folatos pueda ser beneficioso en poblaciones deficientes, sin embargo, en mujeres con niveles adecuados podría no entregar beneficios adicionales, sino constituir un riesgo para la salud.

Objetivo: Revisar sistemáticamente la evidencia científica para conocer los beneficios y/o riesgos descritos en relación a folatos y riesgo para desarrollar cáncer de mama.

Material y Método: Revisión sistemática en Medline, vía Pubmed, considerando específicamente nivel de folatos séricos y/o ingesta de folatos dietarios y/o ingesta folatos totales y riesgo de cáncer de mama.

Resultados: Se encontraron catorce estudios caso-control, catorce estudios de cohorte, siete estudios de caso-control anidados, dos estudios clínicos randomizados y dos metaanálisis que cumplieron con criterios establecidos.

Conclusión: Los estudios revisados no permiten concluir que exista un menor riesgo asociado a mayores consumos de folatos dietarios. Algunos estudios desarrollados tras la fortificación de alimentos muestran un mayor riesgo de cáncer de mama asociado a altas ingestas, especialmente como ácido fólico. Este probable mayor riesgo sugiere considerar la adopción de medidas precautorias para limitar la exposición de las mujeres a ingestas elevadas de ácido fólico, especialmente en países con fortificación obligatoria de alimentos.

Palabras claves: folato, ácido fólico, cáncer de mama, neoplasia de mama, revisión sistemática

Folate and breast cancer risk. Systematic Review

Abstract

Background: An increased of folate intakes may be beneficial in deficient populations, however, in women with adequate levels it may not deliver additional benefits while it may increase risk of some forms of cancer.

Aim: Systematic literature review of benefit and/or risks of folate in the development of breast cancer.

Material and methods: Medline, via Pubmed, systematic review of selected articles and references of the selected articles looking specifically at serum folate levels and/or dietary folate intake and/or total folate intake and risk of developing breast cancer.

Results: Fourteen case-control studies, fourteen cohort studies, seven case-control nested studies, two randomized trials and two meta-analyses were selected for analysis based on pre established criteria.

Conclusions: The reviewed does not support the hypothesis that higher intakes of dietary folate reduce the risk for breast cancer. Some studies showed a higher risk of breast cancer in populations exposed to high folate intake post fortification, especially, when folic acid is used. The results support the need to be caution and to limit the exposure of women to high intakes of folic acid especially in countries with mandatory food fortification.

Key words: folate, folic acid, breast cancer, breast neoplasm, systematic review

Antecedentes

El cáncer de mama es el más frecuente entre las mujeres estimándose una incidencia anual a nivel mundial cercana a un millón de nuevos casos (1). Su etiología no es completamente entendida ya que su desarrollo está relacionado con múltiples factores: genéticos, edad, raza, eventos reproductivos y uso exógeno de hormonas entre otros (2). En estudios de cáncer de mama se ha descrito el hallazgo de tejidos mamarios con ADN hipometilado y con un mayor contenido de folatos (3). Se postula que su efecto sobre el cáncer de mama podría estar mediado por los niveles de ácido fólico, que actuaría modificando la regulación de la expresión de algunos genes, resultando en un silenciamiento de algunos o bien promoviendo el crecimiento de tumores que presentan una mayor expresión de receptores de folatos (4,5).

Considerando que en Chile la implementación de la fortificación obligatoria de la harina de trigo ha determinado un importante aumento de los niveles de folato sérico (6-8), hemos desarrollado la presente revisión con el objetivo de identificar los beneficios y/o riesgos descritos en la literatura científica en diferentes modelos de estudios en relación a folatos y riesgo para desarrollar de cáncer de mama.

Material y Método

Para responder al objetivo de esta revisión sistemática se efectuó una búsqueda en revistas científicas en inglés y español provenientes de la base de datos Medline, vía Pubmed. Se utilizaron los siguientes descriptores de ciencias de la salud, “Medical Subject Headings” (MESH): ácido fólico y neoplasma de mama. Como segunda búsqueda específica se incluyó la palabra folato. Se encontraron 953 artículos de los cuales se seleccionaron los que describían y analizaban la relación entre nivel de folatos séricos y/o ingesta de folatos (dietarios, totales consumidos) y el riesgo para desarrollar cáncer de mama en humanos (Figura 1). Dos revisores independientes considerando los criterios de selección establecidos revisaron y excluyeron los artículos que no alcanzaban el umbral mínimo de calidad para su diseño según la versión española “Critical Appraisal Skills Programme” (CASPe) (9) y aquellos en que no se podía garantizar el control de los sesgos. Las referencias asociadas en los artículos seleccionados fueron revisadas en forma manual para seleccionar otras publicaciones

relevantes en relación a los criterios de selección establecidos. Los criterios de inclusión exclusión y los estudios seleccionados se muestran en las Tablas 1 y 2.

Resultados

Estudios de caso control

Los resultados de los estudios varían desde la inexistencia de una relación (10,11) hasta un aumento del riesgo de cáncer de mama (12) o bien muestran asociaciones no significativas (13-14). En algunos se observa un efecto significativamente protector con mayores consumos de folatos, especialmente en la menopausia (15-18). En otros el riesgo es mayor en la premenopausia (12).

Al analizar por tipo de folatos consumidos, algunos autores describen un menor riesgo de cáncer de mama en relación a ingesta elevada de folatos dietarios en mujeres que no consumían suplementos de ácido fólico (10), sugiriendo que los folatos naturales podrían tener un efecto protector.

Otras publicaciones describen un mayor riesgo de cáncer de mama asociado a niveles elevados de folato totales y plasmáticos, especialmente en mujeres premenopáusicas y portadoras de algunos polimorfismos del gen de la enzima 5-10 metilen-tetrahidrofolato-reductasa (MTHFR C677T y A1298C) (14). Otros muestran una disminución del riesgo de cáncer de mama independiente del nivel de folatos dietarios, especialmente en las variantes homocigotos de la MTHFR C677T y C1298A (TT y CC) (13). Este menor riesgo se observaría especialmente en la postmenopausia sólo cuando el nivel de folatos séricos es elevado, especialmente en el genotipo TT de la MTHFR C677T (19) o con una mayor ingesta de folatos dietarios (10,20,21) (15).

La inclusión en el análisis de diferentes subtipos de receptores hormonales de la mama sugiere que el riesgo de cáncer de mama varía dependiendo del grado de metilación (22), describiéndose un mayor riesgo con bajas ingestas de folatos y de metionina cuando las islas CpG de los receptores estrogénicos (ER) se encuentran metilados y un menor riesgo, aunque no significativo, en cánceres no metilados.

El consumo de alcohol es otro factor de riesgo asociado a un mayor riesgo de cáncer de mama, especialmente cuando la ingesta de folatos es baja debido al mayor

-
requerimiento observado (23), sin embargo, esta asociación no queda claramente demostrada (16,22).

El contenido de vegetales crudos y granos integrales en la dieta, así como el folato dietario asociados a otros componentes como vitamina C y betacarotenos, podrían tener también un significativo efecto protector (24).

Estudios Caso-Control Anidado

Como en el modelo anterior, los resultados de estudios de casos anidados en cohortes muestran resultados conflictivos para la relación folatos y cáncer de mama que van desde la inexistencia de una asociación (25,26) a la descripción de una relación inversa cuando se considera el nivel de folato plasmático, como describe Zhang et al. (27) en población norteamericana.

A diferencia de este último (27), Lin et al (28) encuentra que altos niveles de folatos plasmáticos (>15,8 ng/ml) en mujeres premenopáusicas norteamericanas se asocian positivamente con cáncer de mama (RR=1,99; IC 95% 1,01-3,93; P Interacción 0,05), especialmente tras la fortificación de alimentos (folatos dietarios más fortificados >582 µg/d) (RR=1,24; IC95% 0,88-1,76; P 0,03) (Figura 2).

Otros autores describen que altos niveles de folatos plasmáticos (>17nmol/L) se asocian con un aumento de cáncer en mujeres post-menopáusicas homocigotas o heterocigotas para el alelo T del polimorfismo del gen de la MTHFR C677T (RR=3; IC95% 1,13-7,93; P 0,002), sugiriendo la necesidad de considerar las variaciones genéticas en futuros estudios (29). Cuando se analizan en conjunto los polimorfismos de la MTHFR C677T y C1298A, se observa un significativo aumento del riesgo de cáncer de mama (RR=2,17; IC95% 0,97-4,84; P 0,01) en mujeres homocigotas para ambas variantes (TT y AA) con consumos elevados de folatos. Sin embargo, en heterocigotos CT y AC el riesgo disminuye con consumos elevados, sugiriendo la existencia de una conexión entre ambos polimorfismos (30).

Ericson et al. (31) analizaron el riesgo considerando los receptores estrógenicos alfa y beta (ER α y ERβ) de la mama, mostrando una asociación entre niveles elevados de folatos plasmáticos (>17nmol/L) y cáncer ERβ(-) con o sin polimorfismos de la MTHFR C677T, aún cuando se observa una tendencia positiva entre los portadores del alelo T

(RR=5,78; IC95% 1,96-17,07; P0,01). A diferencia de estos resultados, Lin et al. (28) describió una asociación con ER α (+), aún cuando en otros estudios no se describe un mayor riesgo asociado a estos receptores (32-34).

Un efecto protector del folato se describe en mujeres consumidores de alcohol (25,27), especialmente en mujeres post-menopáusicas (>15 gramos/día) (25), efecto que se mantiene tras ajustar el análisis por la ingesta de diferentes vitaminas (26).

Estudios de Cohorte

No todos los estudios seleccionados muestran una asociación significativa entre altos niveles de folatos y un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama (35-42). Algunos sugieren una asociación inversa entre ingestas moderadas de folatos y cáncer de mama (43,44). Ericson et al. (43) muestran una reducción en la incidencia de cáncer de mama cercana al 40% en los quintiles más altos de consumo de folatos dietarios y totales (HR=0,56; IC 95% 0,35-0,90 y RR=0,56; IC 95% 0,34-0,91) concluyendo que en mujeres postmenopáusicas, un mayor consumo se relacionaría con un menor riesgo. Maruti et al. (45) encontraron que el efecto protector de los folatos, asociado al consumo de ácido fólico, aún cuando el período de seguimiento fue corto (5,5 años) que podría limitar la observación de efectos adversos. Un seguimiento de población superior a 20 años muestra que las mujeres con niveles de folatos en el glóbulo rojo medidos en el cuartil superior de la distribución versus el cuartil inferior tienen un menor riesgo para morbilidad, pero no para mortalidad por cáncer de mama (44).

A diferencia de lo descrito anteriormente, un estudio multicéntrico que investigó la relación entre folatos totales, folatos dietarios, suplementos y cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas mostró un significativo aumento de riesgo con mayores consumos de folatos, especialmente de folatos totales. Las mujeres que consumían suplementos de ácido fólico (>400 mg/día) mostraban un mayor riesgo (19%) en relación a aquellas sin consumo. Las mujeres pertenecientes al quintil superior de consumo de folatos totales mostraban un 32% de mayor riesgo (45). Al considerar el período pre-fortificación de la harina, se observó que el mayor aporte de ácido fólico provenía de cereales fortificados y se asociaba también a un mayor riesgo (RR 1,69 IC 95% 0,92-3,10) (38) (Figura 3 y 4). Recientemente, un aumento de la ingesta de folatos

-
dietarios también se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer de mama en la menopausia (32).

Cuando Larsson et al. (46) incorporaron en el análisis receptores hormonales, se observa que la ingesta de folatos en mujeres pre y post-menopáusicas podría estar inversamente asociada en tumores con receptores positivo de estrógeno (ER+) y negativo de progesterona (PR-) (RR=0,78; IC 95% 0,64-0,95 x c/100 mg/día de incremento de ácido fólico). Por otra parte, Maruti et al. (32) encuentra que el mayor beneficio se observaría con un mayor consumo de folato, incluyendo suplementos, cuando los receptores estrógenicos son negativos (ER-) (RR=0,38; IC95% 0,18-0,8; P 0,02). Una relación diferente se observa en un estudio reciente (42), que muestra una asociación directa, aunque limitada sólo a folatos dietarios y tumores ER+ y PR+, pero no en tumores sólo ER-, semejante a lo descrito por Lin et al (28).

El nivel de riesgo descrito para consumo de alcohol, folatos y cáncer de mama varía entre los diferentes estudios, mostrando que existiría un efecto protector con ingestas elevadas de folatos dietarios, especialmente en mujeres post-menopáusicas (33,38,47,48). Algunos describen una protección débil (39) cuando el consumo es elevado o bien no se demuestra un efecto protector (37,40,46).

Estudios Clínicos Randomizados

Un estudio clínico randomizado doble ciego y placebo controlado en 5442 mujeres mayores de 42 años con enfermedad cardiovascular pre-existente que recibieron 2,5 mg de ácido fólico, más 50 mg de vitamina B₆ y 1 mg de vitamina B₁₂ concluye que no es posible determinar la existencia de beneficios o riesgos en relación a cáncer en general, cáncer de mama o muertes asociadas a cáncer (49). Otro estudio, en 3187 mujeres que recibieron 0,2 y 5 mg de folatos/día durante 25 años muestra un aumento de la mortalidad general en el grupo que recibió folatos y un aumento no significativo en el riesgo de cáncer de mama (HR=2,02; IC95% 0,88-4,72; P 0,1) (50) .

Meta-Análisis

Un metaanálisis que incluyó trece estudios caso-control muestra que una adecuada ingesta de folatos dietarios podría ser protectora contra el cáncer de mama (OR=0,91;

IC95% 0,86-0,96) aunque la gran heterogeneidad de los estudios no permiten concluir que exista realmente una asociación (51). Por otra parte, con los nueve estudios de cohorte examinados no se logra demostrar una asociación entre ingesta de folatos y riesgo de cáncer de mama (RR=0,99; IC 95% 0,98-1,01). De los diecisiete estudios analizados que consideraron el genotipo MTHFR C677T tampoco se extrae ninguna interacción entre los heterocigotos y los homocigotos de este genotipo y el cáncer de mama, así como tampoco, con la ingesta de folatos (51).

Otro metaanálisis de ocho estudios de cohorte no observa la existencia de un mayor riesgo de cáncer en relación a folatos totales y folatos dietarios (RR 0,97; IC 95% 0,87-1,07) y (RR 1,01 IC 95% 0,97-1,05). En los 13 estudios caso-control considerados se muestra una asociación inversa para folato dietario (OR=0,8; IC 95% 0,72-0,89) y para folato total (OR=0,93; IC 95% 0,81-1,07). En los estudios de cohorte prospectivo y en los caso-control que compararon altos niveles de folato sanguíneo versus bajos niveles tampoco se describe alguna asociación significativa, a excepción de las mujeres con consumo de alcohol elevado y un bajo consumo de folatos (RR 0,51; IC 95% 0,41-0,63) (52).

La relación entre algunos polimorfismos genéticos asociados al metabolismo del folato y el riesgo de cáncer de mama, en general, no muestran asociaciones significativas. Cuando se analizan subgrupos de población considerando los genotipos de la MTHFR 677CT y 1298 AC (53) sólo se observa un mayor riesgo de cáncer en mujeres premenopáusicas homocigotas para MTHFR 677TT (RR 1,49; IC 95% 1,09-2,03). Un resultado similar muestra Macis et al. (54) en un metaanálisis basado en dieciocho estudios caso control, con un aumento de riesgo del 40% en mujeres premenopáusicas y homocigotas (TT).

Discusión

Aunque el aumento de la ingesta de folatos pueda ser beneficioso para poblaciones con deficiencias, en mujeres con niveles adecuados de folatos podría no entregar beneficios adicionales, sino más bien constituir un riesgo (38).

El cáncer de mama es una de las patologías más frecuentes en mujeres, determinando un 5 a 7% de todas las muertes en países desarrollados. Estudios de experimentación en

-
animales no muestran un beneficio adicional para tumores de mama cuando se aporta ácido fólico desde el inicio de la gestación, observándose sólo un efecto protector en ratas con dietas deficientes de folatos (55). Sin embargo, estos resultados no son consistentes con los resultados de estudios epidemiológicos.

Un efecto protector asociado a ingestas elevadas de folatos dietarios se muestra en algunos estudios caso-control. Esta ingesta determinaría niveles séricos adecuados de 5 metil-THF y de la coenzima S-adenosil-metionina (SAM), asegurando así, una correcta metilación del ADN, un menor daño y una adecuada expresión de genes reparadores (17). Sin embargo, en otros estudios se observa un mayor riesgo con niveles elevados, especialmente durante la premenopausia, etapa donde existe una mayor proliferación celular y una mayor expresión de receptores de folatos, que limitaría el tiempo para una adecuada reparación del ADN (28). Sin embargo, los resultados de los estudios caso control deben ser analizados con precaución considerando que sus análisis retrospectivos pueden determinar imprecisiones en relación a la estimación de ingesta dietaria de folatos.

Los estudios de cohorte revisados describen riesgos que dependen del tipo de folatos, observándose en algunos que éste aumenta cuando la ingesta de folatos totales (folatos dietarios más suplementos de ácido fólico) es elevada. Esta mayor ingesta, especialmente como ácido fólico, podría contribuir a cambios epigenéticos en la regulación de la expresión de los genes (18). Es importante destacar las diferencias existentes entre los diferentes estudios para definir ingesta elevada de folatos totales; por ejemplo, el estudio de Ericson et al. (30) utiliza valores de 456 mg/día, mientras que Stolzenberg et al. (38) considera valores >853 mg/día. Estas diferencias debieran ser consideradas y controladas en futuros estudios.

La existencia de polimorfismos de las enzimas participantes en el metabolismo del folato podrían explicar las diferencias observadas en el riesgo de cáncer de mama, especialmente en mujeres homocigotas (TT) de la MTHFR 677CT que presentan una menor actividad enzimática (54). Ingestas elevadas de ácido fólico determinarían una acumulación de isómeros distintos a 5-MTHF, empujando esta vía metabólica hacia la síntesis de ADN en desmedro de la metilación. Cuando las ingestas de ácido fólico son elevadas, sólo un porcentaje podría reducirse a tetrahidrofolato activo, determinando

que una parte se mantuviera inactiva, compitiendo con folatos naturales y alterando el metabolismo y el transporte de folatos al interior de las células (27,28). Esto sugeriría que la relación entre folato y cáncer de mama dependería específicamente del polimorfismo analizado, sin tener un rol independiente en la etiología del cáncer de mama (21).

Los meta-análisis publicados en relación folatos y riesgo de cáncer de mama tampoco son concluyentes para identificar riesgos o beneficios dada la heterogeneidad de los estudios (50,51). Sólo se describe una asociación significativa para disminución de cáncer en mujeres con alto consumo de alcohol y bajo consumo de folatos. Sin embargo, cuando se estratifican por premenopausia y menopausia, la premenopausia aparece con un mayor riesgo para las mujeres homocigota TT (53,54).

Al igual que lo descrito en otros tipos de cáncer, pareciera que la relación entre consumo de folatos y desarrollo de cáncer de mama no es lineal, siendo beneficioso un mayor aporte en poblaciones con consumos deficientes, pero determinante de mayores riesgos cuando la ingesta es elevada. Considerando la complejidad del metabolismo del folato, los futuros estudios destinados a identificar riesgos y beneficios debieran considerar las características genéticas de las poblaciones estudiadas, tipos y niveles de folatos consumidos, e identificar además interacciones con otras vitaminas, fotoquímicos y consumo de alcohol (27).

También pareciera importante considerar en futuros estudios de folato y cáncer de mama, los diferentes tipos de receptores hormonales debido a la descripción de mayores riesgos en algunos tipos (30-32). Destaca el mayor riesgo observado con ingestas bajas de folatos y tumores ER β (-) cuya expresión es frecuente en células normales, pero que se observa disminuida en islas CpG metiladas de líneas celulares de tumores primarios y que se estimando que podría actuar como supresor de tumores (33,34).

Los estudios clínicos, randomizados y placebos controlados en relación a folato y cáncer de mama son limitados existiendo sólo una investigación que evalúa los efectos de la suplementación de ácido fólico en forma independiente y que describe un aumento del riesgo de cáncer asociada a ingestas elevadas, tendencia que podría corresponder al

-

azar (50) sugiriendo la necesidad de desarrollar nuevos estudios clínicos en relación a estas materias.

Conclusión

En resumen, en los artículos seleccionados para esta revisión existen grandes diferencias entre los tipos de folatos y también de ingesta dietaria y de folatos séricos considerados para el análisis que no permiten concluir la existencia de un menor riesgo de cáncer de mama asociado a un mayor nivel de consumo. Por otra parte, considerando la existencia de estudios que sugieren un mayor riesgo de cáncer de mama asociado a ingestas elevadas de folatos, especialmente como ácido fólico (35,45) y en etapas posteriores a la fortificación obligatoria de alimentos, pareciera recomendable considerar la adopción de medidas precautorias que limiten la exposición de las mujeres a ingestas elevadas de ácido fólico.

Referencias

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/> (Consultado el 27-11-2010).
2. NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Cancers Trends Progress Report Disponible en: <http://progressreport.cancer.gov/highlights.asp> (Consultado el 27-9-2010).
3. POLLÁN M. Epidemiology of breast cancer in young women. *Breast Cancer Res Treat* 2010;123 Suppl 1:3-6.
4. XU X, CHEN J. One-carbon metabolism and breast cancer: an epidemiological perspective. *J Genet Genomics* 2009; 36(4):203-14).
5. JONES PA, BAYLIN SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3(6):415-28.
6. CASTILLO C, TUR JA, UAUY R. Flour fortification with folic acid in Chile. Unintended consequences. *Rev Med Chil* 2010;138(7):832-40.
7. SÁNCHEZ H, ALBALA C, HERTRAMPS E, VERDUGO R, LAVADOS M, CASTILLO JL ET AL. Prevalence of vitamin B-12 deficiency in older adults. *Rev Med Chil.* 2010;138(1):44-52.
8. HIRSCH S, DE LA MAZA P, BARRERA G, GATTÁS V, PETERMANN M, BUNOUT D. The Chilean flour folic acid fortification program reduces serum homocysteine levels and masks vitamin B-12 deficiency in elderly people. *J Nutr.* 2002;132(2):289-91
9. CASPe (2011) Critical Appraisal Skills Programme Español (CASPe) [homepage]. Alicante, Spain: CASPe; (Consultado el 1 de marzo de 2011). Disponible en <http://www.redcaspe.org>
10. CHEN J, GAMMON MD, CHAN W, PALOMEQUE C, WETMUR JG, KABAT GC, et al. One-carbon metabolism, MTHFR polymorphisms, and risk of breast cancer. *Cancer Res* 2005;65(4):1606-14.
11. MA E, IWASAKI M, KOBAYASHI M, KASUGA Y, YOKOYAMA S, ONUMA H, et al. Dietary intake of folate, vitamin B2, vitamin B6, vitamin B12, genetic

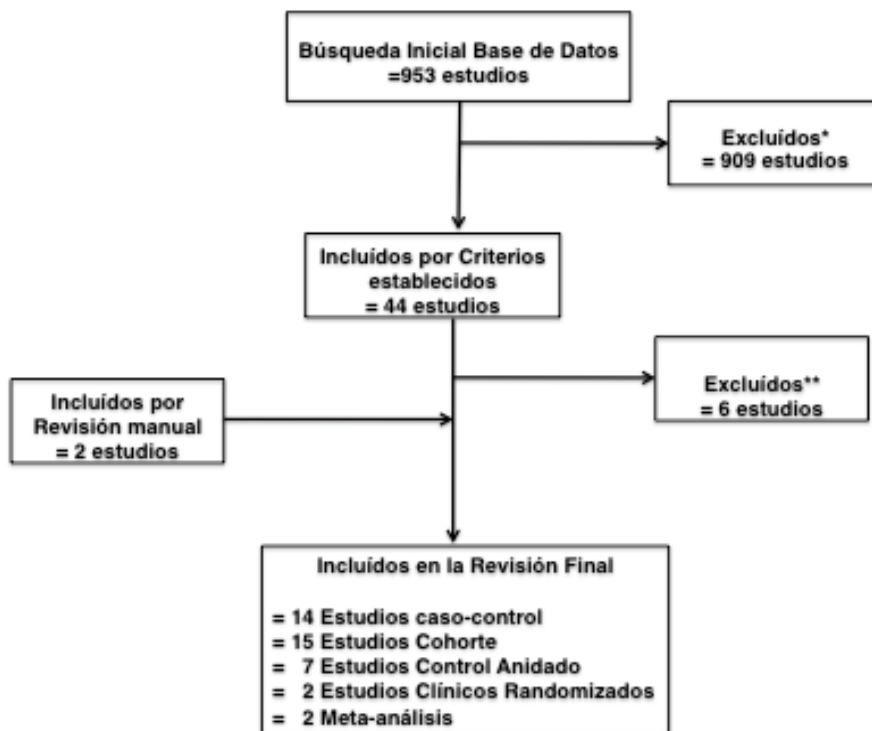
- polymorphism of related enzymes, and risk of breast cancer: a case-control study in Japan. *Nutr Cancer* 2009;61(4):447-56.
12. MA E, IWASAKI M, JUNKO I, HAMADA GS, NISHIMOTO IN, et al. Dietary intake of folate, vitamin B6, and vitamin B12, genetic polymorphism of related enzymes, and risk of breast cancer: a case-control study in Brazilian women. *BMC Cancer* 2009;9:122.
 13. SHARP L, LITTLE J, SCHOFIELD AC, PAVLIDOU E, COTTON SC, MIEDZYBRODZKA Z, et al. Folate and breast cancer: the role of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Cancer Lett.* 2002;181(1):65-71
 14. CHOU YC, WU MH, YU JC, LEE MS, YANG T, SHIH HL, et al. Genetic polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene, plasma folate levels and breast cancer susceptibility: a case-control study in Taiwan. *Carcinogenesis* 2006;27(11):2295-300.
 15. SUZUKI T, MATSUO K, HIROSE K, HIRAKI A, KAWASE T, WATANABE M, et al. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer. *Carcinogenesis* 2008 ;29(2):356-62.
 16. LEVI F, PASCHE C, LUCCHINI F, LA VECCHIA C. Dietary intake of selected micronutrients and breast-cancer risk. *Int J Cancer* 2001;91(2):260-3.
 17. SHRUBSOLE MJ, JIN F, DAI Q, SHU XO, POTTER JD, HEBERT JR, et al. Dietary folate intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Res* 2001; 61(19):7136-41.
 18. LAJOUS M, LAZCANO-PONCE E, HERNANDEZ-AVILA M, WILLETT W, ROMIEU I. Folate, vitamin B(6), and vitamin B(12) intake and the risk of breast cancer among Mexican women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(3):443-8.
 19. BEILBY J, INGRAM D, HÄHNEL R, ROSSI E. Reduced breast cancer risk with increasing serum folate in a case-control study of the C677T genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Cancer* 2004;40(8):1250-4.
 20. SHRUBSOLE MJ, GAO YT, CAI Q, SHU XO, DAI Q, HÉBERT JR, et al. MTHFR polymorphisms, dietary folate intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(2):190-6.

21. SHRUBSOLE MJ, GAO YT, CAI Q, SHU XO, DAI Q, JIN F, et al. MTR and MTRR polymorphisms, dietary intake, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(3):586-8
22. ZHU K, DAVIDSON NE, HUNTER S, YANG X, PAYNE-WILKS K, ROLAND CL, et al. Methyl-group dietary intake and risk of breast cancer among African-American women: a case-control study by methylation status of the estrogen receptor alpha genes. *Cancer Causes Control* 2003;14(9):827-36.
23. NEGRI E, LA VECCHIA C, FRANCESCHI S. Re: dietary folate consumption and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(15):1270-1
24. ADZERSEN KH, JESS P, FREIVOGEL KW, GERHARD I, BASTERT G. Raw and cooked vegetables, fruits, selected micronutrients, and breast cancer risk: a case-control study in Germany. *Nutr Cancer* 2003;46(2):131-7.
25. ROHAN TE, JAIN MG, HOWE GR, MILLER AB. Dietary folate consumption and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(3):266-9.
26. TJØNNELAND A, CHRISTENSEN J, OLSEN A, STRIPP C, NISSEN SB, OVERVAD K, et al. Folate intake, alcohol and risk of breast cancer among postmenopausal women in Denmark. *Eur J Clin Nutr* 2006 ; 60(2):280-6.
27. ZHANG SM, WILLETT WC, SELHUB J, HUNTER DJ, GIOVANNUCCI EL, HOLMES MD, et al. Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, homocysteine, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(5):373-80.
28. LIN J, LEE IM, COOK NR, SELHUB J, MANSON JE, BURING JE, et al. Plasma folate, vitamin B-6, vitamin B-12, and risk of breast cancer in women. *Am J Clin Nutr* 2008;87(3):734-43.
29. ERICSON UC, IVARSSON MI, SONESTEDT E, GULLBERG B, CARLSON J, OLSSON H, et al. Increased breast cancer risk at high plasma folate concentrations among women with the MTHFR 677T allele. *Am J Clin Nutr* 2009; 90(5):1380-9.
30. ERICSON U, SONESTEDT E, IVARSSON MI, GULLBERG B, CARLSON J, OLSSON H, et al. Folate intake, methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, and breast cancer risk in women from the Malmö Diet and Cancer cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(4):1101-10.
31. ERICSON U, BORGQUIST S, IVARSSON MI, SONESTEDT E, GULLBERG B, CARLSON J, et al. Plasma folate concentrations are positively associated with risk

- of estrogen receptor beta negative breast cancer in a Swedish nested case control study. *J Nutr* 2010;140(9):1661-8.
32. MARUTI SS, ULRICH CM, WHITE E. Folate and one-carbon metabolism nutrients from supplements and diet in relation to breast cancer risk. *Am J Clin Nutr* 2009;89(2):624-33.
 33. SELLERS TA, ALBERTS SR, VIERKANT RA, GRABRICK DM, CERHAN JR, VACHON CM, et al. High-folate diets and breast cancer survival in a prospective cohort study. *Nutr Cancer* 2002;44(2):139-44.
 34. ZHANG SM, HANKINSON SE, HUNTER DJ, GIOVANNUCCI EL, COLDITZ GA, WILLETT WC. Folate intake and risk of breast cancer characterized by hormone receptor status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(8):2004-8.
 35. SELLERS TA, KUSHI LH, CERHAN JR, VIERKANT RA, GAPSTUR SM, VACHON CM, et al. Dietary folate intake, alcohol, and risk of breast cancer in a prospective study of postmenopausal women. *Epidemiology* 2001;12(4):420-8.
 36. CHO E, SPIEGELMAN D, HUNTER DJ, CHEN WY, ZHANG SM, COLDITZ GA, et al. Premenopausal intakes of vitamins A, C, and E, folate, and carotenoids, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12(8):713-20.
 37. FEIGELSON HS, JONAS CR, ROBERTSON AS, MCCULLOUGH ML, THUN MJ, CALLE EE. Alcohol, folate, methionine, and risk of incident breast cancer in the American Cancer Society Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12(2):161-4.
 38. STOLZENBERG-SOLOMON RZ, CHANG SC, LEITZMANN MF, JOHNSON KA, JOHNSON C, BUYS SS, et al. Folate intake, alcohol use, and postmenopausal breast cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Am J Clin Nutr* 2006;83(4):895-904
 39. KABAT GC, MILLER AB, JAIN M, ROHAN TE. Dietary intake of selected B vitamins in relation to risk of major cancers in women. *Br J Cancer* 2008;99(5):816-21.
 40. DUFFY CM, ASSAF A, CYR M, BURKHOLDER G, COCCIO E, ROHAN T, et al. Alcohol and folate intake and breast cancer risk in the WHI Observational Study. *Breast Cancer Res Treat* 2009;116(3):551-62.

41. LARSSON SC, BERGKVIST L, WOLK A. Folate intake and risk of breast cancer by estrogen and progesterone receptor status in a Swedish cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(12):3444-9.
42. ROSWALL N, OLSEN A, CHRISTENSEN J, DRAGSTED LO, OVERVAD K, TJØNNELAND A. Micronutrient intake and breast cancer characteristics among postmenopausal women. *Eur J Cancer Prev*. 2010 Sep;19(5):360-5.
43. ERICSON U, SONESTEDT E, GULLBERG B, OLSSON H, WIRFÄLT E. High folate intake is associated with lower breast cancer incidence in postmenopausal women in the Malmö Diet and Cancer cohort. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(2):434-43.
44. ROSSI E, HUNG J, BEILBY JP, KNUIMAN MW, DIVITINI ML, BARTHOLOMEW H. Folate levels and cancer morbidity and mortality: prospective cohort study from Busselton, Western Australia. *Ann Epidemiol* 2006;16(3):206-12.
45. STEVENS VL, MCCULLOUGH ML, SUN J, GAPSTUR SM. Folate and other one-carbon metabolism-related nutrients and risk of postmenopausal breast cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Am J Clin Nutr*. 2010 Jun;91(6):1708-15.
46. LARSSON SC, BERGKVIST L, WOLK A. Folate intake and risk of breast cancer by estrogen and progesterone receptor status in a Swedish cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(12) : 3444-9.
47. BAGLIETTO L, ENGLISH DR, GERTIG DM, HOPPER JL, GILES GG. Does dietary folate intake modify effect of alcohol consumption on breast cancer risk? Prospective cohort study. *BMJ* 2005;3 31(7520):807
48. LAJOUS M, ROMIEU I, SABIA S, BOUTRON-RUAULT MC, CLAVEL-CHAPELON F. Folate, vitamin B12 and postmenopausal breast cancer in a prospective study of French women. *Cancer Causes Control*. 2006; 17(9):1209-13.
49. ZHANG SM, COOK NR, ALBERT CM, GAZIANO JM, BURING JE, MANSON JE. Effect of combined folic acid, vitamin B6, and vitamin B12 on cancer risk in women: a randomized trial. *JAMA* 2008; 300(17):2012-21.
50. CHARLES D, NESS AR, CAMPBELL D, DAVEY SMITH G, HALL MH. Taking folate in pregnancy and risk of maternal breast cancer. *BMJ* 2004; 329(7479):1375-6.

-
51. LEWIS SJ, HARBORD RM, HARRIS R, SMITH GD. Meta-analyses of observational and genetic association studies of folate intakes or levels and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(22):1607-22).
 52. LARSSON SC, GIOVANNUCCI E, WOLK A. Folate and risk of breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(1):64-76 102).
 53. ZINTZARAS E. Methylenetetrahydrofolate reductase gene and susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. *Clin Genet* 2006;69(4):327-36.
 54. MACIS D, MAISONNEUVE P, JOHANSSON H, BONANNI B, BOTTERI E, IODICE S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and breast cancer risk: a nested-case-control study and a pooled meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2008;107(3):459-60. 2007110).
 55. KOTSOPOULOS J, MEDLINE A, RENLUND R, SOHN KJ, MARTIN R, HWANG SW, et al. Effects of dietary folate on the development and progression of mammary tumors in rats. *Carcinogenesis* 2005;26(9):1603-12.



•/** Criterios en Tabla 1

Figura 1. Etapas de la selección de artículos para Revisión Sistemática

-

Tabla 1. Criterios de Inclusión y Exclusión

Criterios Inclusión

Estudios que establecen riesgo (OR, RR) entre diferentes ingesta de folato (totales, dietarios, séricos, ácido fólico) y neoplasia de mama.

Estudios que establecen riesgos (OR, RR) entre diferentes niveles de folato sérico y neoplasia de mama.

Criterios Exclusión

Resúmenes, Reportes de Casos, Editoriales, Revisiones*

Estudios que establecen riesgo (OR, RR) entre diferentes ingesta de folato (totales, dietarios, séricos, ácido fólico) junto a otras vitaminas y neoplasia de mama

Estudios clínicos de drogas para tratamiento de neoplasia de Mama*

Asociaciones de otros nutrientes y neoplasia de Mama*

Asociaciones entre otros marcadores bioquímicos y neoplasia de Mama*

No se entregan datos en relación a riesgos y diferentes niveles de folatos**

Estudios de cohorte con un seguimiento <5 años**

*Primera etapa de selección de estudios

**Segunda etapa de selección de estudios

Tabla 2. Estudios incluidos en la revisión.

<i>Estudios Caso-Control</i>					
Autor* (Ref.)	Año Publicación	País	Casos/Controles	Edad (años)	Folatos Analizados
Levi (16)	2001	Suiza	289/442	23-74	Folato dietario
Shrubsole (17)	2001	China	1321/1382	25-64	Folato dietario
Sharp (13)	2002	Escocia	62/66	50-69	Folato dietario
Adzersen (24)	2003	Alemania	310 /353	25-75	Folato dietario
Zhu (22)	2003	EEUU	304/305	20-64	Folato dietario y A.F
Beilby (19)	2004	Australia	341/109	30-84	Folato sérico
Shrubsole (20)	2004	China	1144/1236	25-64	Folato dietario
Chen (10)	2005	EEUU	1481/ 1518	58,8 (Promedio)	Folato total y dietario
Shrubsole (21)	2006	China	1144/ 1236	25-64	Folato dietario
Lajous (18)	2006	México	475/1391	18-87	Folato dietario
Chou (14)	2006	Taiwán	146/285	20-80	Folato plasmático
Susuki (15)	2008	Japón	456/912	20-79	Folato dietario
Ma (12)	2009	Brasil	458/458	20-74	Folato dietario

Ma (11) 2009 Japón 388/388 20-74 Folato dietario

Estudios Caso-Control Anidado

Autor* (Ref.)	Año Publicación	País	Caso/Controles	Edad (años)	Folatos analizados
Rohan (25)	2000	Canadá	1336/ 5382	>40	Folato dietario
Zhang (27)	2003	EEUU	712/712	57,2	Folato
Tjønneland (26)	2006	Dinamarca	388/388	(Promedio) 50-64	plasmático Folato total, dietario
Lin (28)	2008	EEUU	848 / 848	≥ 45	Folato plasmático
Ericson (29)	2009	Suecia	313/626	>55	Folato plasmático
Ericson (30)	2009	Suecia	544/1088	>55	Folato dietario
Ericson (31)	2010	Suecia	204/408	>55	Folato plasmático

Estudios de Cohorte

Autor* (Ref.)	Año Publicación	País	Población Estudiada	Edad (años)	Seguimiento (años)	Folatos analizados
Sellers (35)	2001	EEUU	34.387	55-69	12	Folato dietario v A.F ‡
Sellers(33)	2002	EEUU	34.393	55-69	12	Folato dietario v A.F ‡
Cho (36)	2003	EEUU	90.655	26-46	8	Folato total y dietario
Feigelson (37)	2003	EEUU	66.561	40-87	5	Folato total y dietario

Baglietto (47)	2005	Australia	17.447	40-69	13	Folato dietario
Rossi (44)	2006	Australia	1024	57 (Promedio)	29 (Mortalidad)	Folato sérico y del glóbulo rojo
Lajous (48)	2006	Francia	62.739	Post- menopausia	23 9	Folato dietario
Stolzenberg (38)	2006	EEUU	25.400	55-74	4,9	Folato dietario y A.F. ‡
Ericsson (43)	2007	Suecia	11.699	≥50	9,5	Folato total y dietario
Kabat (39)	2008	Canadá	49.654	40-59	16,4	Folato dietario
Duffy (40)	2009	EEUU	88.530	50-79	5,5	Folato total
Larsson (41)	2008	Suecia	61.433	53,3 (Promedio)	17,4	Folato dietario
Maruti (32)	2009	EEUU	35.023	50-76	5,5	Folato total, dietario y A.F. ‡
Stevens (45)	2010	EEUU	70.756	50-74	13	Folato total y dietario
Rosswall (42)	2010	Dinamarca	26.224	50-64	10,6	Folato dietario y A.F. ‡

Estudios Clínicos Randomizados

Autor* (Ref.)	Año Publicación	País	Población Intervenida/Placebo	Seguimiento (años)	Suplementación
Charles (50)	2004	Escocia	3187	36	A.F. ‡ 0,2 mg y 5mg

-

Zhang (49)	2008	EEUU	2721/2721	7,3	A.F.‡ 2,5; Vit. B ₆ 50; Vit B ₁₂ 1 mg
------------	------	------	-----------	-----	---

Metaanálisis

Autor* (Ref.)	Año Publicación	Estudios incorporados	Efecto Estimado
Lewis (51)	2006	13 estudios de cohorte 9 estudios caso-control	RR=0,99(0,98-1,01) OR=0,91(0,87-0,96)
Larsson (52)	2007	6 estudios de cohorte 3 estudios caso control	RR=01(IC 95% 0,87-1,14)† RR=0,96(IC 95% 0,87-1,05) †† OR=0,87 (IC95% 0,61-1,23)† OR=0,73 (IC95% 0,64-0,83) ††

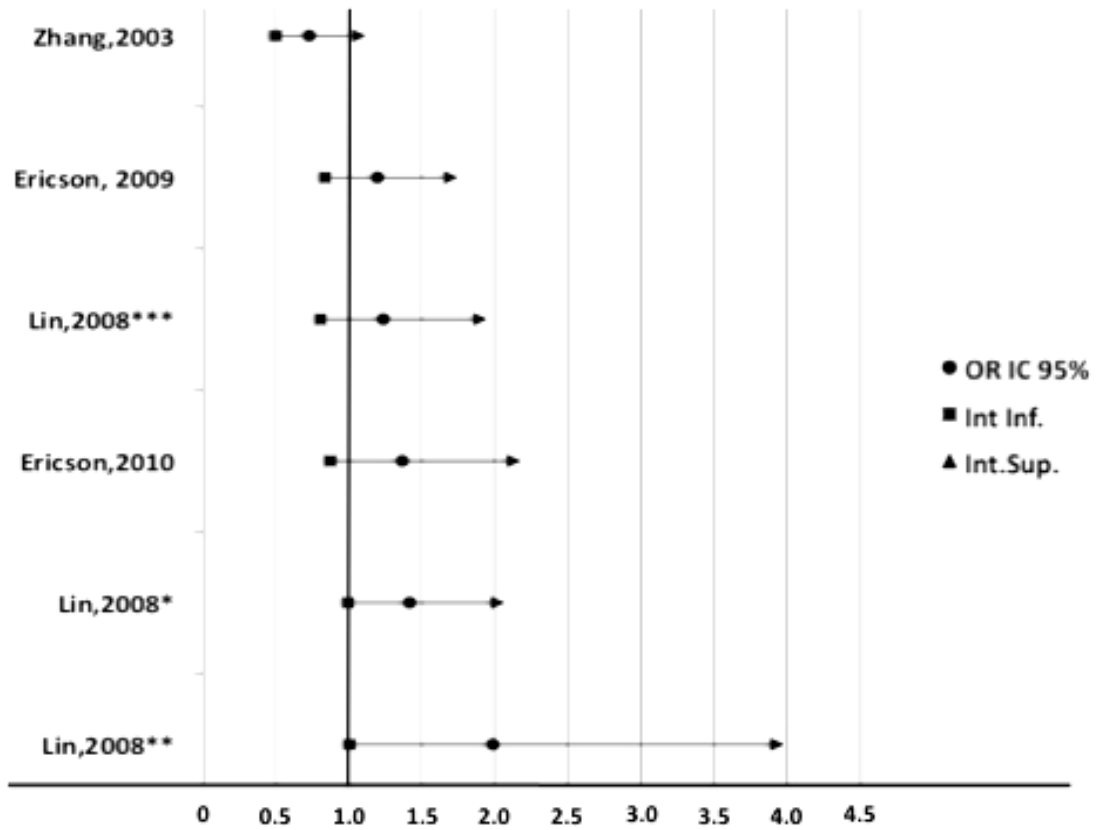
* Sólo se indica el primer autor Ref.= Referencia

Folato total= Folato dietario+ ácido fólico contenido en suplementos vitamínicos

‡ A.F.=ácido fólico como suplemento vitamínico

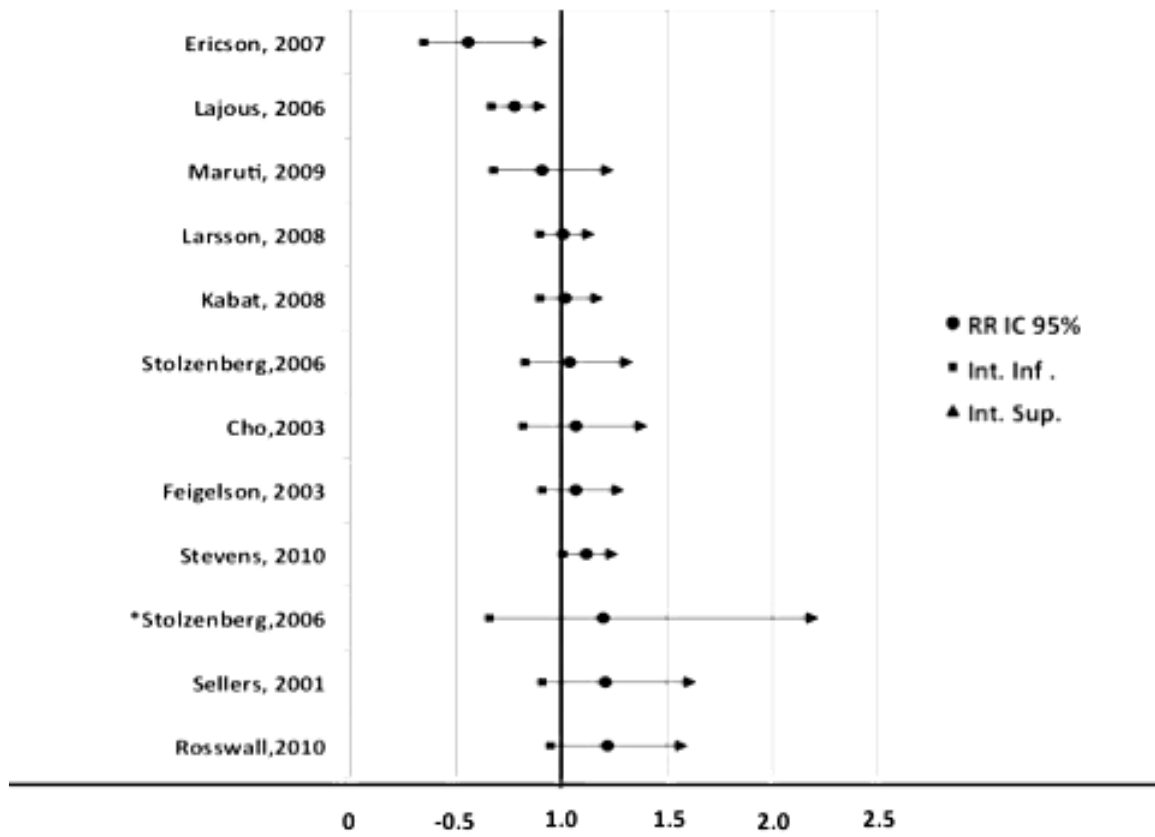
† Folato total

†† Folato dietario



* Pre y Post-menopausia
Pre-menoapausia *Postmenopausia

Figura 2. Folatos plasmáticos y riesgo de cáncer de mama. Estudios Caso-Control Anidados.



*Folatos dietarios sin uso de multivitaminas

Figura 3. Ingesta de folatos dietarios y riesgo cáncer de mama. Estudios de Cohorte.

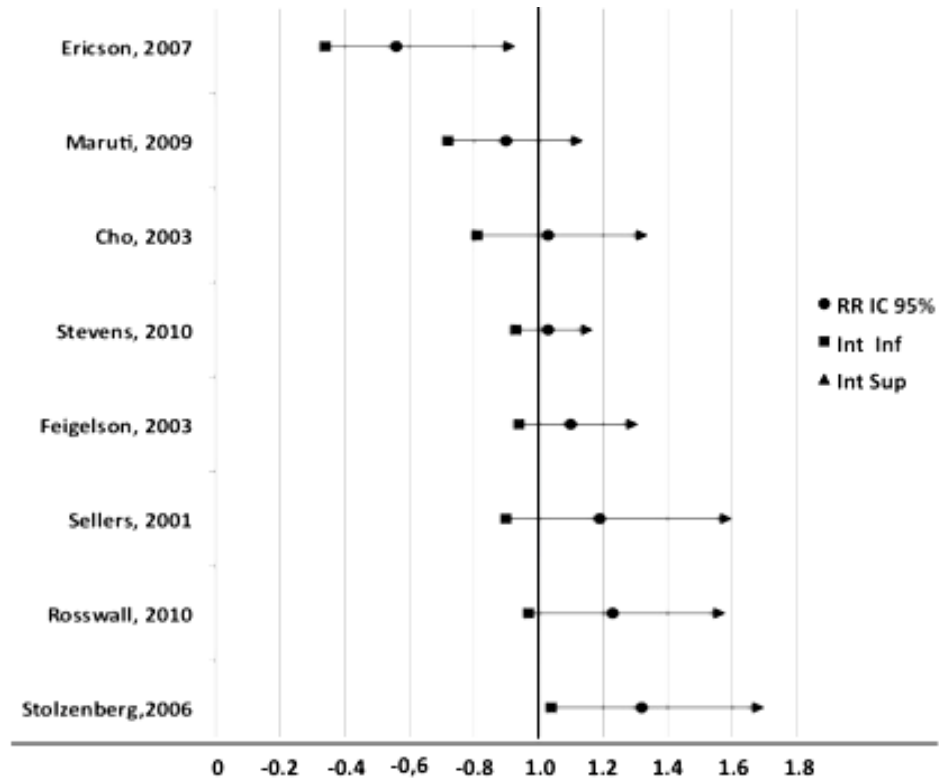


Figura 4. Ingesta de folatos totales y riesgo de cáncer de mama. Estudios de Cohorte.

Manuscrito III

Castillo Lancellotti C, Tur Marí JA, Uauy Dagach R.

**Revisión Sistemática del efecto de los folatos y otros nutrientes
relacionados en la función cognitiva del adulto mayor.**

Nutr Hosp 2012;27(1):90-102.

Revisión Sistemática del efecto de los folatos y otros nutrientes relacionados en la función cognitiva del adulto mayor

Cecilia Castillo Lancellotti¹ , Josep A. Tur Marí¹ , Ricardo Uauy Dagach²

¹Grup de Recerca en Nutrició Comunitària i Estrès Oxidatiu, Dpt. Biologia Fonamental i Ciències de la Salut. Universitat de les Illes Balears. Palma de Mallorca. España.

²Unidad de Salud Pública y Nutrición, Laboratorio de Epidemiología Molecular. Instituto Nutrición y Tecnología en Alimentos, Universidad de Chile. Santiago de Chile.

Correspondencia a: Dra. Cecilia Castillo L. Salvador 100 2º Piso Providencia, Santiago.

Chile Fono 56-2-3662000

Correo: dracastillo@gmail.com

Rcto de Palabras:5343

Resumen

Antecedentes: El folato junto a otras vitaminas del complejo B cumplen importantes funciones en la modulación de la expresión génica y síntesis del ADN siendo necesario para la detoxificación de la homocisteína y la síntesis de neurotransmisores necesarios para el mantenimiento de la función cognitiva.

Objetivo: Revisar sistemáticamente la evidencia científica sobre beneficios y/o riesgos de los folatos en la función cognitiva del adulto mayor.

Material y Método: Revisión sistemática en Medline, vía Pubmed, y en referencias de artículos seleccionados entre años 2005-2011 considerando específicamente nivel de folatos séricos, del glóbulo rojo, ingesta de folatos y función cognitiva en el adulto mayor.

Resultados: Se encontraron doce estudios transversales, tres estudios de cohorte, y seis estudios clínicos randomizados a doble ciego que cumplieron con los criterios pre-establecidos.

Conclusión: Esta revisión no permite concluir que la suplementación de ácido fólico tenga un efecto positivo sobre la función cognitiva en el adulto mayor. Considerando que bajos niveles séricos de folatos podrían relacionarse con un mayor riesgo de deterioro cognitivo y que altos niveles asociados a un bajo nivel de vitamina B₁₂ sérica favorecería un mayor deterioro, se sugiere como medida precautoria revisar los niveles establecidos para fortificar alimentos con ácido fólico para limitar riesgos y maximizar beneficios.

Palabras claves: ácido fólico, cognición, revisión sistemática

Effect of Folate and related nutrients on cognitive function in older people: Systematic Review

Abstract

Background: Folate and other B complex vitamins play important roles in the synthesis of DNA, gene expression, homocysteine detoxification and synthesis of neurotransmitters necessary for the maintenance of cognitive function.

Aim: Systematic literature review of benefit and/risksoffolatein cognitive function in older adults.

Material and methods: Medline via Pubmed systematic review of selected articles from years 2010 and May 2011 and references of the selected articles looking specifically at serum folate levels, red cell and folate intake and cognitive function in older adults.

Results: Twelve cross-sectional studies, three cohort studies and six randomized double-blind clinical studies that met pre-established criteria were selected for analysis.

Conclusions: This review doesn't support a benefit from folic acid supplementation on cognitive function in the elderly. Whereas low folate serum levels may be related to increased risk of cognitive impairment and high levels associated with low levels of vitamin B₁₂ can contribute a further deterioration, it is suggested as precautionary measure to re-examine the present level of food fortification with folic acid to maximize benefits and limit potential risks.

Key words: folic acid, cognition, executive function, systematic review

Abreviaturas

ADN Ácido Desoxiribonucleico

AF Ácido Fólico

AMM Ácido metilmalónico

DE Desviación Estándar

GR Glóbulo Rojo

DHFR Dihidrofolato reductasa

MMSE Mini Examen del Estado Mental

MTHFR Metiltetrahidrofolato reductasa

NHANES Encuesta Nacional de Salud de los Estados Unidos

SAH S-adenosil-homocisteína

SAM S-adenosil-metionina

3 MMSE Mini Examen del Estado Mental Modificado

5 MTHF 5-metil-tetrahidrofolato

5,10-metilenTHF 5,10-metilen-tetrahidrofolato

Introducción

Numerosos estudios describen la importancia de la nutrición y la alimentación, especialmente de algunos nutrientes como vitaminas, elementos trazas y ciertos ácidos grasos, en la longevidad y calidad de vida de los adultos mayores, así como también, el efecto que sus deficiencias pueden tener en la función cognitiva (1-3).

La función bioquímica del folato es mediar la transferencia de una unidad de carbono para la biosíntesis de nucleótidos, el desarrollo del ciclo de la metionina y de reacciones biológicas de metilación. Participa en la conversión bioquímica de la homocisteína a metionina y la posterior síntesis S-adenosil-metionina (SAM). La entrega de metilos por parte de SAM conduce a la formación de S-adenosil-homocisteína (SAH) y de homocisteína cuando pierde su grupo adenosilo. La homocisteína participa nuevamente en un nuevo ciclo de síntesis de metionina o bien, es metabolizada a través de la síntesis de cisteína (4,5). Dentro de ellos, el folato cumple importantes funciones en la síntesis de ácido desoxiribonucleico (ADN) que codifica todas las proteínas, y en el mantenimiento de la función cognitiva en relación con la síntesis de neurotransmisores (4).

El ciclo metabólico del folato se relaciona con otras vitaminas del complejo B como son las vitaminas B₂ y B₆ y en forma especial con la vitamina B₁₂. Esta actúa sobre la enzima metionina-sintetasa que remetila la homocisteína formando metionina usando el metilo entregado por 5-metil-tetra-hidrofolato (5-MTHF), interviniendo además, en la isomerización de L-metil-malonil-coenzimaA a succinil-coenzimaA (Figura 1).

La deficiencia de folatos, así como también de vitamina B₁₂, se traduce en una reducción de SAM y en un aumento de la homocisteína plasmática que contribuye al deterioro cognitivo por su efecto oxidante sobre proteínas funcionales y estructurales de neuronas y endotelio (5), así como también participa en la inhibición de las reacciones dependientes de la metilación que incluye la síntesis de neurotransmisores (6). El déficit de folato produce una anemia morfológicamente semejante a la anemia por carencia de vitamina B₁₂. Cuando ambas deficiencias coexisten, el aporte de folatos puede mejorar la anemia megaloblástica enmascarando el déficit de vitamina B₁₂ y el desarrollo de una neuropatía secundaria (4). El ácido fólico, la forma sintética de los folatos, fue desarrollado en el año 1945 siendo utilizada ampliamente a partir de esa fecha en el

tratamiento de la anemia perniciosa. La suplementación fue seguida por un aumento en las complicaciones neurológicas en los pacientes, que pudieron posteriormente ser revertidas cuando la vitamina B₁₂ fue aislada e incorporada en el tratamiento (7).

El ácido fólico se ha utilizado en la fortificación de harina de trigo en numerosos países con el objetivo de disminuir la incidencia de algunas malformaciones congénitas del recién nacido (8,9). Esta medida ha sido evaluada como exitosa y costo efectiva en la reducción específica de las malformaciones del tubo neural (10). Su implementación ha determinado un aumento en los niveles de folatos séricos no sólo de la embarazada, sino también, de toda la población intervenida (11,12). Numerosos estudios sugieren que el incremento en los niveles de folatos séricos esta asociado a mayores riesgos en salud, especialmente del sistema nervioso en los adultos mayores. Esto establece la necesidad de evaluar cuidadosamente quienes se benefician y quienes se podrían perjudicar con esta intervención.

Se ha descrito que un bajo nivel de folato sérico se asociaría a una menor capacidad cognitiva como fallas en la memoria, disminución de la orientación, de la abstracción y de la capacidad para resolver problemas, favoreciendo una mayor velocidad de deterioro de la función cognitiva, específicamente cuando estos altos niveles se asocian a un bajo nivel de vitamina B₁₂ (13-15). El aporte excesivo de folato sintético sobrepasaría la capacidad metabólica de la enzima dihidro-folato-reductasa (DHFR) para transformar el ácido fólico en 5-MTHF, determinando la presencia de ácido fólico libre en la circulación sanguínea. (16). Por otra parte, una alta ingesta de folato, especialmente como folato sintético (ácido fólico) podría tener otras consecuencias desfavorables promoviendo el desarrollo de tumores (17).

Considerando que en Chile se estableció la fortificación obligatoria de harina de trigo con ácido fólico desde el año 2000, se ha desarrollado la presente revisión con el fin de identificar los beneficios y riesgos descritos en relación a la ingesta de folatos en la función cognitiva considerando la documentación existente de un aumento en la prevalencia de niveles elevados de folato sanguíneo observado en Chile (8,11,12) y en otros países(18-19).

Método

Se efectuó una revisión sistemática de la literatura a través de la búsqueda electrónica de revistas científicas en idioma inglés y español entre enero del año 2005 y abril de 2011 provenientes de la base de datos Medline, vía Pubmed. Los descriptores de ciencias de la salud (Medical Subject Headings) utilizados para la búsqueda fueron cognición y ejecución cognitiva en adultos utilizando la categoría mayor de 45 años como límite inferior de edad con el fin de incluir el mayor número de estudios. Estos descriptores fueron combinados con el descriptor ácido fólico y con la palabra folato. Se encontraron 563 artículos potenciales de ser considerados en la revisión que fueron reducidos a 96 artículos después de revisar los títulos y leer los resúmenes correspondientes. De éstos, se seleccionaron aquellos que describían y analizaban la relación entre ingesta de folato dietario, folato total (folato contenido en los alimentos y suplementado), nivel de folato sérico y del glóbulo rojo con la función cognitiva medida según diferentes pruebas de evaluación (Tablas 1-3). También fueron seleccionados los estudios que además de folato, evaluaban el nivel sérico y de ingesta de las vitaminas del complejo B que participan en el ciclo del folato (Vitamina B₂, B₆ y B₁₂). Los estudios cuyo objetivo era evaluar exclusivamente demencias y/o enfermedad de Alzheimer o evaluaban la suplementación con otras vitaminas diferentes a las mencionadas anteriormente fueron excluidos. Considerando que un descenso en el nivel de folato sérico puede predecir el deterioro cognitivo durante un tiempo de observación superior a dos años, se seleccionaron los estudios con seguimientos superiores a este período (20). En los estudios randomizados se incluyeron todos los ensayos con asignación al azar a doble ciego y controlados con placebo que comparaban la ejecución cognitiva resultante de la suplementación con ácido fólico, con o sin suplementación de las vitaminas B₂, B₆ y B₁₂ y los que incorporaban en el análisis el nivel de homocisteína. Dado que el nivel de folatos séricos se estabiliza después de un tiempo de suplementación superior a tres meses (16), se excluyeron los estudios randomizados con un tiempo de seguimiento menor a este período. Las referencias asociadas en los artículos considerados en este estudio fueron revisados posteriormente en forma manual para seleccionar e incluir otras publicaciones relevantes que no aparecieran en la búsqueda inicial y que cumplieran con los criterios de selección establecidos (Figura 2).

En total se seleccionaron doce estudios transversales, seis estudios de cohorte y seis estudios clínicos randomizados a doble ciego (Tablas 1-3).

Resultados

Estudios transversales

Las relaciones descritas en los estudios seleccionados en relación a folato y función cognitiva muestra la existencia de diferentes asociaciones. En algunos, los resultados muestran un mayor riesgo de deterioro cognitivo cuando los sujetos presentan bajos niveles de folato sérico (13-14, 21-26) o cuando existe un alto nivel de folatos junto a bajos niveles de vitamina B₁₂ (16,27-30) o bien no se describe una asociación significativa entre folato y diferentes niveles de vitamina B₁₂(31).

Un estudio en sujetos franceses sanos mayores de 65 años, muestra la presencia de un mayor riesgo de deterioro cognitivo cuando éstos presentaban un bajo nivel de folato sérico (hombres <5,5 ng/ml; mujeres <6,1 ng/ml) y un alto nivel de homocisteína (hombre >18,2 µmol/L y mujeres > 16 µmol/L), observándose que éstos obtenían los menores puntajes en las cinco pruebas de evaluación cognitiva utilizadas (25). En este estudio no se describe una asociación entre ejecución cognitiva y vitamina B₁₂.

Feng et al. (13) describe en una población de adultos mayores chinos de Singapur, la existencia de una asociación independiente y diferente tanto para folatos como para homocisteína en algunas de las pruebas de ejecución del área cognitiva. En este estudio, los folatos parecen estar asociados específicamente con la memoria episódica y la habilidad en el lenguaje, en cambio la homocisteína lo hace con el área de habilidad constructiva y con la velocidad de procesamiento de la información. Al igual que lo descrito por Vidal et al. (25) en una población francesa, en este estudio no se observa una asociación significativa entre el nivel sérico de vitamina B₁₂ con las diferentes pruebas de evaluación cognitiva, sugiriendo que su rol podría ser menos importante que el folato y la homocisteína en el mantenimiento de estas funciones. Otro estudio desarrollado en una población asiática con baja ingesta de folatos muestra que los factores con mayor significación estadística asociados al deterioro cognitivo son la

edad, el consumo de tabaco y la baja concentración de folato séricos ($P=0,000$; $0,0005$ y $0,0009$ respectivamente) (26).

Un estudio en población holandesa con un promedio de folatos séricos de $14,2 \pm 8,6$ nmol/L describe una mejoría significativa en la función cognitiva global, en la velocidad psicomotora y en la memoria cuando el nivel de folato plasmático aumenta, resultados que no se modifican cuando el nivel de homocisteína se incluye en el análisis (14). Este estudio incorpora además una evaluación cerebral a través de resonancia magnética y describe una asociación inversa entre folatos plasmáticos y la presencia de lesiones severas de la sustancia blanca cerebral, un tipo de lesión especialmente presente en sujetos hipertensos o que han sufrido un ictus y cuyos mecanismos fisiopatológicos no están suficientemente aclarados (32). Como este tipo de lesión se considera un marcador de enfermedad isquémica cerebral, la asociación entre un bajo nivel de folatos y deterioro cognitivo podría ser explicada más bien por la falla de algún mecanismo vascular que por un proceso neurodegenerativo (14).

Un estudio desarrollado con posterioridad a la fortificación de harina con ácido fólico en una población latina de Estados Unidos que utilizó siete instrumentos para evaluar la función cognitiva en forma global y por subdominios específicos, muestra que el nivel de folato en el glóbulo rojo está directamente asociado con la cognición, especialmente con la ejecución del Mini-Examen del Estado Mental Modificado (3MMS) que evalúa memoria, atención y lenguaje y cuya escala va de 0 a 100. El riesgo relativo para una menor función cognitiva evaluada por 3MMS (puntaje ≤ 78) disminuye en forma significativa con un aumento en la concentración de folatos ($OR=0,51$; IC 95% $0,32-0,83$ $P=0,006$) después de ajustar el modelo por nivel de homocisteína y por algunas variables demográficas. Cuando el riesgo de deterioro cognitivo se evalúa considerando nivel de homocisteína y el análisis se controla por nivel de folatos del GR se observa que la asociación no alcanza a ser significativa (23).

Clarke R et al. estudia en población inglesa la relación entre folatos séricos, el nivel de vitamina B₁₂ y la existencia de una falla cognitiva usando el Mini Examen del Estado Mental (MMS) (puntaje <25 sobre 30), no encontrando una asociación significativa con altos niveles de folatos séricos (>30 y 60 nmol/L) ($OR=1,5$; IC 95% $0,91-2,46$ y

OR=2,46; IC95% 0,9-6,71 respectivamente) o cuando éste coexistía con un bajo nivel sérico de vitamina B₁₂, definido como nivel de holotranscobalamina <45pmol/L (24).

A diferencia del estudio de Ramos et al. en población latina (23), otro estudio desarrollado en Estados Unidos después de la fortificación de alimentos con ácido fólico describe una asociación diferente entre folato y deterioro cognitivo (27). Utilizando los datos de la Encuesta Nacional de Salud de los Estados Unidos (NHANES 1999 y 2002) y la Prueba de Codificación de Dígitos y Símbolos de la Escala de Inteligencia de Wechsler para adultos III como evaluación del estado cognitivo en relación a nivel de folato, Morris et al. muestran que un nivel elevado de folato sérico (>59 nmol/L) cuando se asocia a un bajo nivel sérico de vitamina B₁₂ definido como <148 pmol/L o como un nivel de AMM >60-210 nmol/L determinaría un riesgo de deterioro cognitivo cinco veces mayor (OR=4,9; IC 95% 2,6-9,2). Por otra parte, cuando los niveles folato sérico son elevados y los de vitamina B₁₂ son normales se obtendría un efecto protector (OR=0,5; IC95% 0,2-0,96) (30). Estos mismos autores sugieren que altos niveles de folato sérico y bajos de vitamina B₁₂ podrían determinar niveles mayores no sólo de homocisteína, sino también de ácido metilmalónico (AMM) que se produciría por una falla en el funcionamiento de las enzimas ligadas a la vitamina B₁₂ (metionina-sintetasa y metil-malonil-CoA-mutasa) (28,29). Estos resultados son consistentes con los datos publicados por Miller et al.(31) que muestra que los sujetos con niveles más elevados de folato sérico pero más bajo de vitamina B₁₂ presentaban las más altas concentraciones de homocisteína y AMM y la más baja concentración de holotranscobalamina, aún cuando el punto de corte definido para folatos séricos en este estudio fue más bajo (45,3 nmol/L). Sin embargo, en este estudio no se observan diferencias significativas en la función cognitiva entre grupos con alto y bajo nivel sérico de folatos y con niveles de vitamina B₁₂<148 pmol/L (31).

Un estudio posterior que analiza el desempeño cognitivo en la misma población (NHANES 1999-2002), aplicando la misma prueba de valoración de la función cognitiva, muestra un riesgo similar a lo descrito anteriormente en relación a altos niveles de folatos séricos y bajos de vitamina B₁₂ considerando, considerando no solo el nivel sérico de esta vitamina, sino que incorporando además el nivel de AMM (>210 nmol/L) (OR=5,1 IC 95% 2,7-9,5) (16).

Un estudio reciente en adultos mayores de 60 años que analizó en forma separada los niveles de 5 metil-THF y de ácido fólico sérico encontró que alrededor de la mitad de la población que consumía sobre 584 µg/día de ácido fólico presentaba en sangre niveles detectables sin metabolizar. Aquellos que, además, tenían un bajo nivel sérico de vitamina B₁₂ definido como <148 pmol/L o un nivel elevado de AMM ≥210 nmol/L, presentaban un desempeño cognitivo casi cinco puntos más abajo que aquellos sin ácido fólico sérico libre evaluados a través la Prueba de Codificación de Dígitos y Símbolos (Coeficiente β= -4,86 IC 95% -9,09-0,63). Cuando se analiza los sujetos que presentaban un mayor nivel sérico de folato, pero sin ácido fólico circulante y que presentaban además bajos niveles de vitamina B₁₂, se describe un mayor riesgo para una menor ejecución cognitiva que no alcanza significancia estadística (OR=1,33; IC 95% 0,45-3,93). También se observa que la asociación específica entre nivel de 5-MTHF y el desempeño cognitivo fue positiva (30).

Estudios de cohorte

Dentro de los estudios seleccionados, algunos describen un mayor deterioro con un menor niveles de folato (22,33,34), otros en cambio muestran un mayor riesgo de deterioro asociado a altos niveles (35) o bien los resultados no describen la existencia de una asociación (36,37).

Un estudio con adultos mayores holandeses mayores de 85 años seguidos durante 5 años muestra que los sujetos con un nivel elevado de folato sérico (14,1 nmol/L) y de vitamina B₁₂ (259 pmol/L) logran los mejores puntajes en la evaluación cognitiva global medida por la prueba 3MMS, al igual que aquellos con un bajo nivel de homocisteína (cuartil inferior <11,7 mmol/L). Los individuos que sobrevivieron a los 89 años mostraban una relación entre función cognitiva similar cuando se mantenía esta relación de folatos y vitamina B₁₂. Cuando se evaluó la influencia de los niveles de folato, vitamina B₁₂ y homocisteína durante cada año del seguimiento, los resultados de los diversas pruebas de ejecución cognitiva también mostraron una asociación semejante; sin embargo, los niveles iniciales de vitaminas no fueron capaces de predecir el rango de deterioro en los años siguientes, siendo el tiempo, la variable más significativa para el deterioro cognitivo en este grupo de adultos mayores (33).

En un estudio desarrollado en 3718 norteamericanos mayores de 65 años Morris et al. Observa que una mayor ingesta de folato total se asocia positivamente con una mayor declinación cognitiva medida por diferentes pruebas: Mini-Examen del Estado Mental (MMSE), “East Boston Test” y la Prueba de Codificación de Dígitos y Símbolos. En los análisis ajustados por diversas variables demográficas y educacionales se observa que los sujetos con un mayor consumo de folatos y que recibían más de 400 $\mu\text{g}/\text{día}$ de ácido fólico presentaban una velocidad de deterioro cognitivo significativamente mayor que aquellos que no lo consumían (Coeficiente $\beta = -0,3$ vs. Coeficiente $\beta = -0,1$; $P=0,001$). En los sujetos mayores de 80 años que presentaban mayores consumos de vitamina B₁₂ (20 $\mu\text{g}/\text{día}$) se observó una menor declinación cognitiva, efecto que no se observaba en los ancianos de 70 años (35).

A diferencia de los estudios de Mooijaart et al. (33) y Morris et al. (35), otro estudio desarrollado en una cohorte de 1779 americanos de origen mexicano entre 60 y 101 años, con posterioridad a la fortificación de alimentos, seguidos durante cuatro años medio, no describe una asociación entre el nivel de folato del glóbulo rojo y la existencia de deterioro cognitivo (36).

Estudios clínicos randomizados

Durga et al. evaluó el efecto de la suplementación exclusiva de ácido fólico (800 $\mu\text{g}/\text{día}$) en la función cognitiva de un grupo de adultos holandeses con niveles de homocisteína superior a 13 ng/ml, valores normales de vitamina B₁₂ y que no presentaban deterioro cognitivo (38). La función cognitiva fue evaluada utilizando pruebas de memoria, velocidad sensitivo-motora, velocidad compleja, procesamiento de la información y fluidez verbal. Los mejores resultados se observaron en el grupo intervenido al final de los tres años de intervención, específicamente en las pruebas que evaluaban memoria (Diferencia de Puntaje $Z=0,131$ IC95% 0,032-0,233 $P=0,01$) y velocidad de procesamiento de información (Diferencia de Puntaje $Z=0,087$ IC95% 0,016-0,158 $P=0,016$). La fluidez verbal, así como, la evaluación de la velocidad compleja, un área sensible en el envejecimiento que mide la atención selectiva y el tiempo en que se logra un mejor procesamiento de la información, no fueron afectadas por la suplementación con ácido fólico (38).

Otros estudios evalúan la función cognitiva y el efecto de la suplementación de ácido fólico asociado a otras vitaminas pero mediada por un descenso de nivel de homocisteína. Eussen et al. investigaron si la suplementación diaria con altas dosis de vitamina B₁₂ (1000 µg), sola o combinada con ácido fólico (400 µg), tendría efectos beneficiosos en la cognición de adultos mayores de 70 años con deficiencia moderada de vitamina B₁₂. Tras 24 semanas de suplementación, se observó un aumento en los niveles de folato, de vitamina B₁₂, de holotranscobalamina, una caída en AMM y de homocisteína en relación al grupo placebo. La ejecución cognitiva fue evaluada a través de múltiples pruebas en las áreas de atención, construcción, velocidad sensomotora, memoria y función ejecutiva. Los resultados no permiten observar una mejoría en la función cognitiva después de 24 semanas de suplementación con ácido fólico más vitamina B₁₂ o con una suplementación exclusiva de vitamina B₁₂. En este estudio, tanto los suplementados con ácido fólico más vitamina B₁₂, como aquellos que recibieron sólo vitamina B₁₂, así como también el grupo placebo, muestran una mejoría significativa en las pruebas de memoria, destacando incluso un resultado significativamente mejor en el grupo control en las pruebas de retención de dígitos y reconocimiento de palabras(39).

Un estudio desarrollado en Nueva Zelanda en adultos mayores de 70 años suplementados con 1000 µg/día de ácido fólico, 500 µg de vitamina B₁₂ y 10 mg de vitamina B₆ y cuyo objetivo era demostrar que la disminución de la homocisteinemia podía asociarse a una mejoría en la función cognitiva no mostró mejores resultados en las pruebas de desempeño cognitivo cuando el nivel de folato sérico aumenta y el de homocisteína se reduce de 13 a 4,23 umol/L. Al igual que lo observado por Eussen et al.(39), el grupo control muestra un mejor resultado en el puntaje combinado de las ocho pruebas de cognición utilizadas(40).

La intervención en 299 hombres australianos hipertensos mayores de 75 años suplementados con ácido fólico (2 mg), vitamina B₆ (25 mg) y B₁₂ (0,4 mg) durante dos años no muestra diferencia en las pruebas de ejecución cognitiva en individuos tratados y no tratados(41). Después de ocho años de seguimiento se observa una disminución no significativa (28%) del riesgo de fallo cognitivo y de demencia (OR=0,72; IC95% 0,25-2,09 y OR=0,72; IC 95% 0,29-1,78, respectivamente) sugiriendo que una suplementación diaria no reduce el riesgo de deterioro cognitivo en ancianos. Aún

cuando en otros estudios clínicos se observa una reducción del nivel de homocisteína asociado a la suplementación de ácido fólico y otras vitaminas asociadas al metabolismo del folato, especialmente de vitamina B₁₂, los beneficios de esta intervención en la cognición no logran ser demostrados en forma clara y convincente (42,43).

Discusión

Los folatos cumplen importantes funciones en el crecimiento, diferenciación, desarrollo y reparación cerebral, así como también, en la cognición, ánimo y envejecimiento. Un bajo aporte determina errores en la síntesis, transcripción e integridad del ADN determinado por una menor producción de purinas, especialmente de timidina y por un aumento en los niveles de homocisteína. También determina una menor donación de metilos y metilación del ADN, importante no sólo para la expresión genética, sino también para otros mecanismos epigenéticos que pueden contribuir a la desmielinización y al recambio de monoaminas implicadas en la depresión (44). Estudios en animales muestran que un aporte adecuado de ácido fólico determinaría un crecimiento de los axones sensoriales del cordón espinal de ratas contusas, sugiriendo que un aporte adecuado podría contribuir a la reparación del sistema nervioso de los adultos (45).

Por otra parte, una deficiencia severa y prolongada de folatos y de vitamina B₁₂ se relaciona con una menor síntesis de metionina a partir de la homocisteína, donde ambas vitaminas cumplen un rol como cofactor dependiente de la enzima metionina-sintetasa y que se traduce en un aumento en el nivel de homocisteína. Existe evidencia de que un alto nivel de homocisteína puede inducir daño en el sistema nervioso central determinando deterioro cognitivo, demencia y enfermedad de Alzheimer (46). Los mecanismos que explicarían este daño podrían estar dados por una falla en el metabolismo del glutatión o un aumento del estrés oxidativo que determinaría daño neuronal y que limitaría la reducción de vitaminas al interior de la neurona a una forma metabólicamente inactiva (46). El déficit de estas vitaminas también se asociaría a fallos en la metilación del ADN que podrían incrementar la síntesis del péptido amiloide B determinante de la enfermedad de Alzheimer (46, 47).

Si bien los estudios transversales no permiten determinar causalidad, los resultados observados sugieren que altas concentraciones séricas de folato estarían asociadas a una mejor ejecución cognitiva en adultos mayores (13,14,21). De Lau et al. (14) describe una relación dosis respuesta que no se modifica cuando se ajusta por otras variables, entre ellas el nivel de homocisteína, sugiriendo que el efecto del folato en la función cognitiva no se relacionaría solamente con la disminución del nivel de homocisteína, sino que tendría un efecto independiente. Una de las limitaciones de los estudios transversales es el cambio en la ingesta dietética asociada al grado de deterioro cognitivo en los sujetos estudiados, que pueden modificar la ingesta de nutrientes y los niveles séricos de vitaminas, aún cuando en muchos de los estudios analizados se seleccionaron individuos sanos. Debe tenerse presente además, que otras variables como enfermedad vascular, uso de medicamentos o consumo de tabaco y alcohol también pueden modificar los resultados.

Cuando se comparan estudios que evalúan folatos y función cognitiva es importante considerar además, las diferencias en los niveles séricos que tienen las poblaciones analizadas. Por ejemplo, en países con fortificación obligatoria de alimentos se ha observado un importante aumento de los niveles de folatos séricos (11,48,49), así como también en aquellos con fortificación voluntaria, aunque no en la magnitud de lo observado en Estados Unidos en la etapa post-fortificación de harina de trigo, donde un 65% de la población presenta niveles de folato sérico superiores a 30 nmol/L. En Inglaterra, un país con fortificación voluntaria, este aumento se ha asociado a un efecto positivo en la función cognitiva, pero que no necesariamente estaría mostrando el efecto de una suplementación prolongada y con altas dosis como la observada en los norteamericanos (24).

En algunos estudios desarrollados en la etapa post-fortificación de alimentos, se observa un efecto beneficioso en la función cognitiva en aquellos individuos que presentan altos niveles de folatos séricos y valores normales de vitamina B₁₂, pero cuando éstos se asocian a bajos niveles de vitamina B₁₂ se observa una mayor velocidad de deterioro cognitivo. Al parecer existiría una diferencia metabólica entre los folatos naturales que circulan normalmente como 5 metil-THF y el ácido fólico sintético. Este último es transformado a 5 metil-THF cuando atraviesa la mucosa intestinal por una enzima con capacidad de conversión limitada, por lo tanto, una ingesta elevada de ácido fólico

puede determinar su aparición en la sangre en una forma sin metabolizar que podría ser significativo en el deterioro cognitivo y del funcionamiento del sistema nervioso central porque alteraría la síntesis de ADN. La hipótesis del atrapamiento de metilos explicaría las consecuencias del déficit de vitamina B₁₂ asociado a altos niveles de folatos y sus consecuencias neuro-psiquiátricas. Altas concentraciones de folato sérico actuarían como antagonista después de la etapa de conversión del folato de 5-10 metilén-THF a 5-metil-THF que es catalizada por la enzima metil-tetrahidrofolato-reductasa (MTHFR) y que es una reacción irreversible en condiciones fisiológicas. Como el 5-metil-THF dona metilos para la conversión de homocisteína a metionina en un proceso dependiente de la vitamina B₁₂, el déficit de esta vitamina produciría su acumulación dentro de la célula debido a que no puede ser convertida a tetrahidrofolato, el precursor obligado para la poliglutamación del folato y que permite su retención al interior de la célula, así como tampoco podría volver a convertirse en 5,10-metilén-THF. Este atrapamiento limitaría la síntesis de metionina que podría explicar los efectos observados en la parte cognitiva. Cuando existe una deficiencia de vitamina B₁₂ se produciría entonces no solo la acumulación de 5 MTHF, sino que el folato permanecería como monoglutamato porque no puede ser convertido a la forma de tetrahidrofolato necesario para la síntesis de poliglutamatos. De esta manera, el monoglutamato podría salir fácilmente de la célula a circulación (50,51).

El seguimiento de 3718 adultos mayores por Morris et al. en población norteamericana muestra que altas ingestas de folatos, asociadas especialmente al consumo de suplementos de ácido fólico (400-1200 mg/día) y bajos niveles séricos de vitamina B₁₂ se relacionarían con una mayor velocidad de declinación cognitiva en ancianos (35). La hipótesis de Selhub et al. propone que altos niveles de folatos, especialmente de ácido fólico y algunos metabolitos como el dihidrofolato, la forma reducida del ácido fólico, podrían servir como aceptor de electrones (agentes oxidantes), acelerando el promedio de oxidación de la enzima metionina-sintetasa-cob(I)alamina catalíticamente activa a MS-cob(II)alamina una forma inactiva, pudiendo a través de esta oxidación intracelular exacerbar el déficit de vitamina B₁₂. Esto determinaría un fallo primario de la enzima metionina-sintetasa que cataliza la conversión de homocisteína a metionina y que utiliza el 5-metil-tetrahidrofolato como donador de metilos, produciendo de este modo, una menor disponibilidad de vitamina B₁₂ como cofactor para reacciones mitocondriales. De

esta forma, se comprometerían algunas de las reacciones asociadas que aumentarían la deficiencia de vitamina B₁₂, los niveles de homocisteína y de AMM con las respectivas consecuencias neurológicas. Es decir, niveles elevados de folato sérico podrían interferir en la acción de la enzima metionina-sintetasa de una manera similar a lo observado con el uso del óxido nítrico, que oxida en forma irreversible el sitio de unión a la vitamina (28).

Por otra parte, algunos estudios describen que un bajo nivel de folato y un elevado nivel homocisteína estarían asociados a una menor ejecución cognitiva (22). Esto podría contribuir a identificar sujetos en riesgo en forma precoz, aún cuando estos niveles de folatos y de homocisteína no servirían para predecir cuanto sería el aumento de la declinación cognitiva (35). La homocisteína es un marcador de la alteración del ciclo del metabolismo de un carbono que tendría un efecto neurotóxico directo que podría ser modificado según algunos autores por el nivel de vitamina B₁₂, pero no necesariamente por el nivel de folato sérico. Es probable que en estos estudios, la asociación con folato no aparezca como significativa, debido a que en muchas de las poblaciones analizadas no se encuentran sujetos con deficiencias como resultado de la fortificación de alimentos.

La existencia de estudios que describen una relación entre folatos y función cognitiva que dependería del nivel sérico de vitamina B₁₂ (30,52) determina la necesidad de revisar cuales son los parámetros utilizados para determinar su deficiencia. Esta consideración pareciera importante porque se ha observado que cuando se utilizan exclusivamente niveles séricos de vitamina B₁₂ se podría subestimar el déficit. (52). La incorporación de otros marcadores de deficiencia más sensibles como el AMM y la holotranscobalamina permitirían un mejor diagnóstico y una mejor identificación de las relaciones entre folato y vitamina B₁₂ cuyos puntos de corte recomendados serían 150 pmol/L para vitamina B₁₂ basado en los más bajos niveles de AMM observados y 300 pmol/L considerando el nivel más bajo de homocisteína obtenido (52,53).

De los seis estudios clínicos randomizados, solo uno evalúa el efecto exclusivo de la suplementación de ácido fólico (800 µg) en la función cognitiva. Los estudios que evalúan el efecto del ácido fólico, en conjunto con otras vitaminas del ciclo de folato, en la disminución del nivel de homocisteína y la función cognitiva no describen una

asociación, destacando en algunos de ellos, que el mejor desempeño se observa en los sujetos no intervenidos (3,40). Esta mejor respuesta podría corresponder a un efecto placebo o bien a un proceso de aprendizaje secundario a la repetición de las pruebas de evaluación cognitiva. A diferencia de los efectos observados en estos estudios, Durga et al.(38) describe resultados positivos asociados a la suplementación de ácido fólico que podrían ser atribuidos a las características de los sujetos estudiados quienes presentaban al inicio altos niveles de homocisteína y valores normales de vitamina B₁₂. Sin embargo, este no permite establecer si los efectos positivos descritos en relación a la cognición se podrían observar también con menores dosis de ácido fólico.

Una limitante en los resultados de los estudios randomizados analizados es el tiempo de evaluación, que varía entre tres a veinticuatro meses, que podría ser insuficiente para observar los efectos derivados de la intervención. Las diferencias existentes al inicio de los estudios de variables tales como nivel educacional y función cognitiva, también son determinantes en los resultados al final del período de observación, pudiendo constituir una limitación sino son adecuadamente controladas. Estas diferencias pueden modificar las respuestas en las pruebas de función cognitiva, de tal modo que, sujetos con una menor función cognitiva o diferente nivel educacional podrían tener resultados diferentes con pruebas de evaluación similares. Es importante considerar además, que los sujetos estudiados por ser adultos mayores tienen en esta etapa de la vida un mayor riesgo de deterioro cognitivo que puede limitar la interpretación de los resultados.

La gran diversidad de pruebas utilizadas en los diversos estudios para evaluar función cognitiva limita la comparación de los resultados y donde una agregación de puntajes de las diferentes pruebas puede confundir aún más los resultados. Por ello, pareciera recomendable en futuros estudios, utilizar sólo pruebas estandarizadas y validadas por especialistas que permitan evaluar cada prueba por separado, conocer los resultados de pruebas combinadas y diferenciar los resultados según área cognitiva.

Al igual que lo descrito en otras revisiones sistemáticas y metanálisis (54-56), esta revisión no permite concluir que la suplementación de ácido fólico tenga un efecto positivo en la función cognitiva de los adultos mayores. Considerando los resultados de algunos estudios que muestran que bajos niveles séricos de folatos y vitamina B₁₂ determinarían niveles elevados de homocisteína, un factor de riesgo independiente para

deterioro cognitivo y considerando que otros estudios describen una mayor velocidad de deterioro cognitivo con niveles elevados de folato sérico cuando coexiste con un bajo nivel sérico de vitamina B₁₂ , pareciera recomendable como medida precautoria, revisar los niveles de fortificación de alimentos, en especial, en los países con fortificación mandataria de ácido fólico, así como también, la entrega de suplementos que lo contienen, de tal modo de mantener el efecto preventivo de deterioro cognitivo en la deficiencia de folatos, pero limitando una ingesta elevada, especialmente cuando ésta se asocia a un déficit de vitamina B₁₂.

Referencias

1. Gillette Guyonnet S, Abellan Van Kan G, Andrieu S, Barberger Gateau P, Berr C, Bonnefoy M, et al. IANA task force on nutrition and cognitive decline with aging. *J Nutr Health Aging* 2007;11(2):132-5).
2. Del Parigi A, Panza F, Capurso C, Solfrizzi V. Nutritional factors, cognitive decline and dementia. *Brain Res Bull* 2006;69(1):1-19).
3. Smith PJ, Blumenthal JA. Diet and neurocognition: review of evidence and methodological considerations. *Curr Aging Sci* 2010;3(1):57-66.
4. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary reference intakes: thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline. Report of the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins and Choline and Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients. Washington, DC: National Academy Press, 1998.
5. Quadri P, Fragiaco C, Pezzati R, Zanda E, Forloni G, Tettamanti M, et al. Homocysteine, folate, and vitamin B₁₂ in mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and vascular dementia. *Am J Clin Nutr* 2004;80(1):114-22
6. Mischoulon D, Raab MF. The role of folate in depression and dementia. *J Clin Psychiatry*. 2007;68 Suppl 10:28-33)
7. Reynolds E. Vitamin B₁₂, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol*. 2006;5(11):949-60.
8. Castillo C, Tur JA, Uauy R. Flour fortification with folic acid in Chile. Unintended consequences. *Rev Med Chil* 2010;138(7):832-40.
9. Lawrence MA, Chai W, Kara R, Rosenberg IH, Scott J, Tedstone A. FDA. Examination of selected national policies towards mandatory folic acid fortification. *Nutr Rev* 2009;67 Suppl 1:S73-8
10. Llanos A, Hertrampf E, Cortes F, Pardo A, Grosse SD, Uauy R. Cost-effectiveness of a folic acid fortification program in Chile. *Health Policy* 2007;83(2-3):295-303.

11. Sánchez H, Albala C, Hertrampf E, Verdugo R, Lavados M, Castillo J, et al. Prevalence of vitamin B₁₂ deficiency in older adults]. *Rev Med Chil* 2010;138(1):44-52.
12. Hirsch S, de la Maza P, Barrera G, Gattás V, Petermann M, Bunout D. The Chilean flour folic acid fortification program reduces serum homocysteine levels and masks vitamin B₁₂ deficiency in elderly people. *J Nutr* 2002;132(2):289-91.
13. Feng L, Ng TP, Chuah L, Niti M, Kua EH. Homocysteine, folate, and vitamin B₁₂ and cognitive performance in older Chinese adults: findings from the Singapore Longitudinal Ageing Study. *Am J Clin Nutr* 2006;84(6):1506-12
14. de Lau LM, Refsum H, Smith AD, Johnston C, Breteler MM. Plasma folate concentration and cognitive performance: Rotterdam Scan Study. *Am J Clin Nutr* 2007;86(3):728-34.
15. Selhub J, Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH. Folate-vitamin B₁₂ interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B₁₂ deficiency. *Am J Clin Nutr* 2009;89(2):702S-6S
16. Sweeney MR, McPartlin J, Scott J. Folic acid fortification and public health: report on threshold doses above which unmetabolised folic acid appear in serum. *BMC Public Health* 2007;7:41.
17. Kim Yi. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51(3):267-92.
18. Ray JG, Vermeulen MJ, Boss SC, Cole DE. Declining rate of folate insufficiency among adults following increased folic acid food fortification in Canada. *Can J Public Health* 2002;93:249-253.
19. Choumenkovitch SF, Selhub, Wilson PF, Rader JI, Rosenberg IH, Jacques P. Folic acid intake from fortification in United States exceeds predictions. *J Nutr* 2002;132:2792-2798.
20. Kim JM, Kim SW, Shin IS, Yang SJ, Park WY, Kim SJ, et al. Folate, vitamin B(12), and homocysteine as risk factors for cognitive decline in the elderly. *Psychiatry Investig.* 2008;5(1):36-40.

21. Tettamanti M, Garrì MT, Nobili A, Riva E, Lucca U. Low folate and the risk of cognitive and functional deficits in the very old: the Monzino 80-plus study. *J Am Coll Nutr* 2006;25(6):502-8.
22. Kado DM, Karlamangla AS, Huang MH, Troen A, Rowe JW, Selhub J, et al. Homocysteine versus the vitamins folate, B₆, and B₁₂ as predictors of cognitive function and decline in older high-functioning adults: MacArthur Studies of Successful Aging. *Am J Med* 2005;118(2):161-7.
23. Ramos MI, Allen LH, Mungas DM, Jagust WJ, Haan MN, Green R, et al. Low folate status is associated with impaired cognitive function and dementia in the Sacramento Area Latino Study on Aging. *Am J Clin Nutr* 2005;82(6):1346-52.
24. Clarke R, Sherliker P, Hin H, Molloy AM, Nexø E, Ueland PM, et al. Folate and vitamin B₁₂ status in relation to cognitive impairment and anaemia in the setting of voluntary fortification in the UK. *Br J Nutr* 2008;100(5):1054-9.
25. Vidal JS, Dufouil C, Ducros V, Tzourio C. Homocysteine, folate and cognition in a large community-based sample of elderly people-the 3C Dijon Study. *Neuroepidemiology* 2008;30(4):207-14.
26. Lee LK, Shahar S, Rajab N. Serum folate concentration, cognitive impairment, and DNA damage among elderly individuals in Malaysia. *Nutr Res* 2009;29(5):327-34.
27. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B₁₂ status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr* 2007;85(1):193-200.
28. Selhub J, Savaria MS, Jaques PF. In vitamin B₁₂ deficiency, higher serum folate is associated with increased total homocysteine and methylmalonic acid concentrations. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104 (50):19995-20000
29. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Hyperhomocysteinemia associated with poor recall in the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* 2001;73(5):927-33.
30. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and

- cognitive test performance in American seniors. *Am J Clin Nutr* 2010;91(6):1733-44.
31. Miller JW, Garrod MG, Allen LH, Haan MN, Green R. Metabolic evidence of vitamin B₁₂ deficiency, including high homocysteine and methylmalonic acid and low holotranscobalamin, is more pronounced in older adults with elevated plasma folate. *Am J Clin Nutr* 2009;90(6):1586-92.
 32. Álvarez-Sabin J, Donato JM. Lesiones de la sustancia blanca cerebral: significado clínico y mecanismos fisiopatológicos. *Hipertensión y riesgo cardiovascular* 2004; 21(1):38-42
 33. Mooijaart SP, Gussekloo J, Frölich M, Jolles J, Stott DJ, Westendorp RG, et al. Homocysteine, vitamin B₁₂, and folic acid and the risk of cognitive decline in old age: the Leiden 85-Plus study. *Am J Clin Nutr*. 2005;82(4):866-71.
 34. Tucker KL, Qiao N, Scott T, Rosenberg I, Spiro A 3rd. High homocysteine and low B vitamins predict cognitive decline in aging men: the Veterans Affairs Normative Aging Study. *Am J Clin Nutr* 2005;82(3):627-35.
 35. Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Hebert LE, Scherr PA, et al. Dietary folate and vitamin B₁₂ intake and cognitive decline among community-dwelling older persons. *Arch Neurol* 2005;62:641-5.
 36. Haan MN, Miller JW, Aiello AE, Whitmer RA, Jagust WJ, Mungas DM, et al. Homocysteine, B vitamins, and the incidence of dementia and cognitive impairment: results from the Sacramento Area Latino Study on Aging. *Am J Clin Nutr*. 2007 Feb;85(2):511-7.
 37. Kang JH, Irizarry MC, Grodstein F. Prospective study of plasma folate, vitamin B₁₂, and cognitive function and decline. *Epidemiology* 2006;17(6):650-7.
 38. Durga J, van Boxtel MP, Schouten EG, Kok FJ, Jolles J, Katan MB, et al. Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial. *Lancet* 2007;369(9557):208-16.
 39. Eussen SJ, de Groot LC, Joosten LW, Bloo RJ, Clarke R, Ueland PM, et al. Effect of oral vitamin B-12 with or without folic acid on cognitive function in older

- people with mild vitamin B₁₂ deficiency: a randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2006;84(2):361-70.
40. McMahon JA, Green TJ, Skeaff CM, Knight RG, Mann JI, Williams SM. A controlled trial of homocysteine lowering and cognitive performance. *N Engl J Med* 2006;354(26):2764-72.
 41. Ford AH, Flicker L, Alfonso H, Thomas J, Clarnette R, Martins R, et al. Vitamins B₁₂, B₆, and folic acid for cognition in older men. *Neurology* 2010;75(17):1540-7.
 42. Stott DJ, MacIntosh G, Lowe GD, Rumley A, McMahon AD, Langhorne P, et al. Randomized controlled trial of homocysteine-lowering vitamin treatment in elderly patients with vascular disease. *Am J Clin Nutr* 2005;82(6):1320-6.
 43. Lewerin C, Matousek M, Steen G, Johansson B, Steen B, Nilsson-Ehle H. Significant correlations of plasma homocysteine and serum methylmalonic acid with movement and cognitive performance in elderly subjects but no improvement from short-term vitamin therapy: a placebo-controlled randomized study. *Am J Clin Nutr* 2005;81(5):1155-62.
 44. Reynolds EH. Folic acid, ageing, depression, and dementia. *BMJ* 2002;324(7352):1512-5.
 45. Iskandar BJ, Nelson A, Resnick D, Skene JH, Gao P, Johnson C, et al. Folic acid supplementation enhances repair of the adult central nervous system. *Ann Neurol* 2004;56(2):221-7.
 46. McCaddon A, Regland B, Hudson P, Davies G. Functional vitamin B₁₂ deficiency and Alzheimer disease. *Neurology* 2002;58(9):1395-9.
 47. Irizarry MC, Gurol ME, Raju S, Diaz-Arrastia R, Locascio JJ, Tennis M, et al. Association of homocysteine with plasma amyloid beta protein in aging and neurodegenerative disease. *Neurology* 2005;65(9):1402-8.
 48. Quinlivan EP, Gregory JF 3rd. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr* 2003;77(1):221-5.

49. Brown RD, Langshaw MR, Uhr EJ, Gibson JN, Joshua DE. The impact of mandatory fortification of flour with folic acid on the blood folate levels of an Australian population. *Med J Aust* 2011;194(2):65-7.
50. Quinlivan EP. In vitamin B₁₂ deficiency, higher serum folate is associated with increased homocysteine and methylmalonic acid concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(5):E7.
51. Weir DG, Scott JM. Brain function in the elderly: role of vitamin B₁₂ and folate. *Br Med Bull* 1999;55 (3): 669-82.
52. Selhub J, Jacques PF, Dallal G, Choumenkovitch S, Rogers G. The use of blood concentrations of vitamins and their respective functional indicators to define folate and vitamin B12 status. *Food Nutr Bull* 2008;29(2 Suppl):S67-73.
53. Refsum H, Smith AD. Low vitamin B₁₂ status in confirmed Alzheimer's disease as revealed by serum holotranscobalamin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:959-61.
54. Balk EM, Raman G, Tatsioni A, Chung M, Lau J, Rosenberg IH. Vitamin B₆, B₁₂, and folic acid supplementation and cognitive function: a systematic review of randomized trials. *Arch Intern Med* 2007;167(1):21-30.
55. Malouf R, Grimley Evans J. Folic acid with or without vitamin B₁₂ for the prevention and treatment of healthy elderly and demented people. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(4):CD004514.
56. Wald DS, Kasturiratne A, Simmonds M. Effect of folic acid, with or without other B vitamins, on cognitive decline: meta-analysis of randomized trials. *Am J Med* 2010;123(6):522-527.

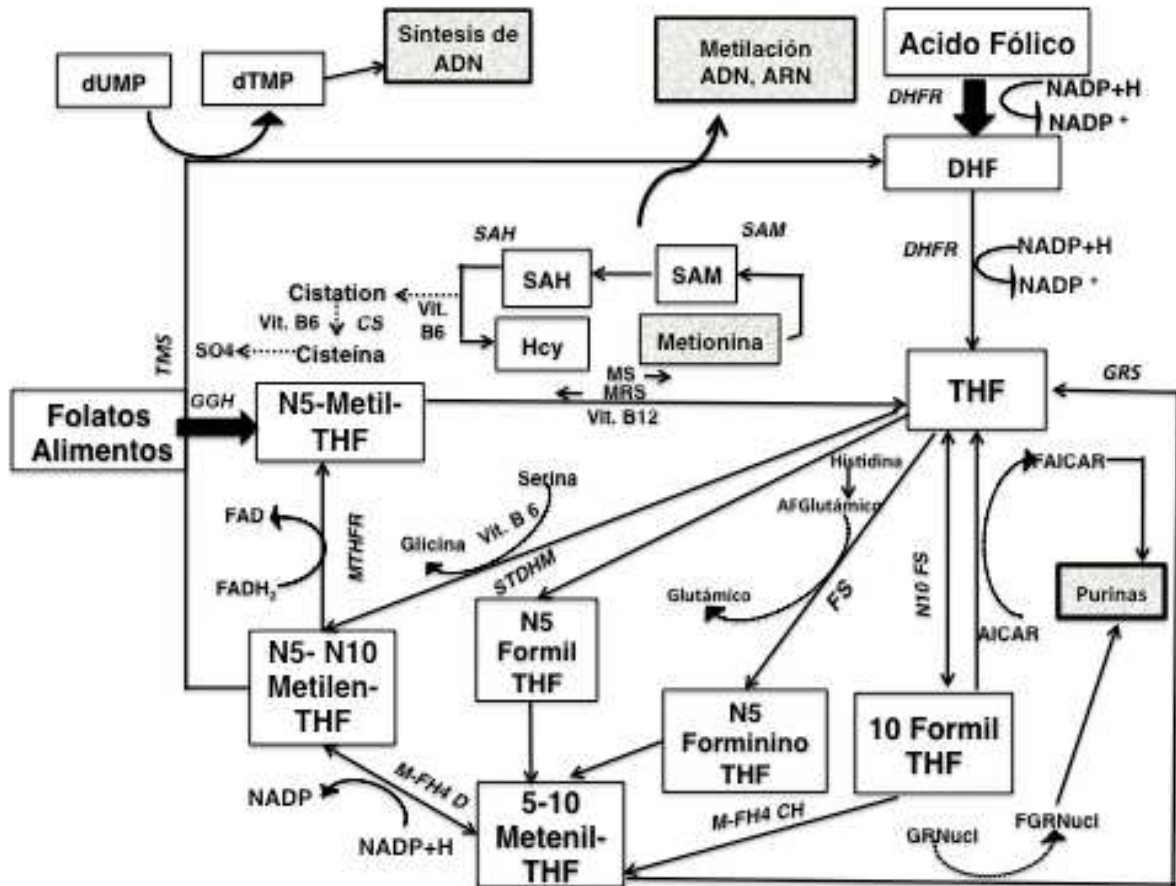
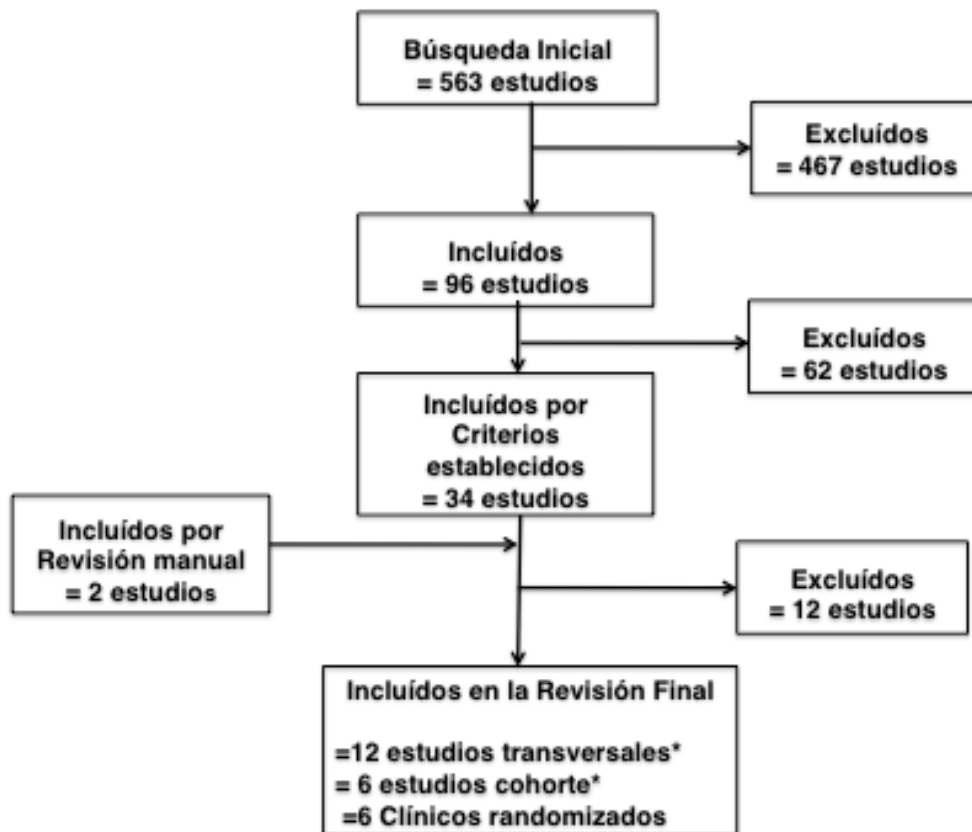


Figura 1. Metabolismo del Folato

Adaptado de M. Hernández Rodríguez, A. Sastre Gallego. Tratado de Nutrición Capítulo 10. Vitaminas Hidrosolubles Pag. 172 Edición Díaz de Santos 1999.

Abreviaturas: AICAR 5-Amino-4-imidazol-carboxamida; CS Cistation-sintetasa; DHF Dihidrofolato; DHFR Dihidrofolato-reductasa; dTMP 2-Deoxi-timidina-monofosfato; dUMP 2-Deoxiuridina-monofosfato; FAD y FADH₂ Flavin-adenín dinucleótido oxidado y reducido; FAICAR 5-Amino-formil-imidazol-carboxamida; FGRNucl Formilglicinamida-ribonucleótido; FS Formilino-sintetasa; GGH Gamma-glutamil hidrolasa; GRNucl Glicinamida-ribonucleótido; GRS Glicinamida ribonucleótido sintetasa; M-FH4D Metilen-tetrahydrofolato-deshidrogenasa; M-FH4CH 5-10 Metenil-tetrahydrofolato-ciclohidrolasa; MS Metionina-sintetasa; MSR Metionina-sintetasa reductasa; MTHFR Metil-tetrahydrofolato reductasa; NADP Nicotinamida-adenín-dinucleótido; NADP+H Nicotinamida-adenín-dinucleótido-fosfato; N5 Metil-THF N-5 Metil tetrahydrofolato; N10 FS N10 Formil Tetrahydro-sintetasa; SAH S-Adenosil -homocisteína-hidrolasa; SAM S-Adenosil Metionina-sintetasa; STDHM Serina transhidroximetilasa; THF Tetrahydrofolato; TMS Timidilato-sintetasa.



* Referencia 22 incluye un estudio transversal y un estudio de cohorte

Figura 2. Flujograma de los artículos incluidos y excluidos en la Revisión Sistemática

Tabla 1. Folato y Función Cognitiva. Estudios Transversales.

Autor# (Ref)	Año País	Número Sujetos	Edad (años)	Folatos Estudiados	Nivel de Folatos	Pruebas de Evaluación Cognitiva
Kado (22)	2005 EEUU	499	70-79	Folato sérico ng/ml	6,62±5,59	Habilidad del Lenguaje Memoria de largo plazo Copia de figuras geométricas Reconocimiento largo plazo Semejanza de Wechsler Adaptada
Ramos (23)	2005 EEUU	1789	≥60	Glóbulo Rojo ng/ml	488(50-900)	3 MSE † Recuerdo Diferido Nombrar Objetos Asociación de Imágenes Pensamiento Conceptual y Verbal Capacidad de Atención Verbal Reconocimiento de Patrones
Tettamanti (21)	2006 Italia	471	87,4 Promedio	Folato sérico ng/ml	4,8±2,3	MMSE †† AIVD* SBI-bADL**
Feng (13)	Singapur 2006	451	≥55	Folato sérico (nmol/L)	24,9±12,4	Retención de dígitos Capacidad de memoria de trabajo visual espacial RAVLT ^Δ Reproducción visual Diseño y Fluidez verbal categorizada Dígitos y símbolos Prueba de Trazado Diseño de habilidad y construcción visual

Autor# (Ref.)	Año País	Número Sujetos	Edad (años)	Folatos Estudiados	Nivel de Folatos	Pruebas de Evaluación Cognitiva
Morris (27)	EEUU 2007	1459	>70	Folato sérico nmol/L	39± 0,7* 34±1,4 **	Codificación de dígitos y símbolos
de Lau (14)	Holanda 2007	1033	60-90	Folato sérico nmol/L	14,2±8,6	Función cognitiva global ^o Velocidad sicomotora ^{oo} Función de memoria ^{ooo}
Clarke (24)	Inglaterra 2008	2403	>65	Folato sérico nmol/L	21.8±21.3	MMSE ††
Vidal (25)	Francia 2008	3914	>65	Folato sérico ng/ml	8±3,2	MMSE †† Isaacs Prueba de Trazado Prueba de retención visual de Benton Prueba de memoria de 5 palabras Cuestionario de evaluación cognitiva del anciano
Lee (26)	Malasia 2009	232	68 Promedio	Folato sérico nmol/L	13,7±8,8 Hombres 15,2±9 Mujeres	Prueba de dígitos y símbolos ^{ae}
Selhub (15)	EEUU 2009	1302	>60	Folato sérico	59 (Percentil 80)	
Miller (31)	EEUU	1535	>60	Folato sérico (nmol/L)	45,3 ◇	3 MSE † Prueba de dígitos y símbolos ^{ae}
Morris (30)	EEUU 2010	1858	70	5Metil-THF (nmol/L) Acido Fólico	42; 40; 37 ◇◇ 41;41;42 ◇◇◇ ø	

Primer autor

† 3 MSE= Mini-Examen del Estado Mental Modificado

†† Mini-Examen del Estado Mental

^Δ Test de Aprendizaje Auditivo Verbal de Rey

[‡] Actividades instrumentales de la vida diaria

^{‡‡} Entrevista Básica de comportamiento espontáneo de actividades de la vida diaria

[°] Puntaje compuesto por Pruebas de Stroop en papel y lápiz, sustitución de dígitos, recuerdo inmediato y diferido de 15 palabras en la Prueba Verbal de Aprendizaje

[∞] Puntaje compuesto por Prueba de Stroop, Pruebas en papel y lápiz y Prueba de sustitución de dígitos

^{∞∞} Compuesto por 3 ensayos de recordatorio y uno de recordatorio diferido de 15 palabras

^æ Prueba derivada de la Escala Wechsler de Inteligencia para Adultos (WAIS)

◇ Definido como nivel elevado de folatos

◇◇ Valores promedios en sujetos con anemia, macrocitosis y Prueba de Sustitución de dígitos <30

◇◇◇ Valores promedios en sujeto sin anemia, macrocitosis y Prueba de Sustitución de dígitos >30

∅ Ácido fólico: Detectable o no detectable

*Asociado a un nivel sérico normal de vitamina B12 ** Asociado a un nivel sérico bajo de vitamina B12 <148pmol/L o de ácido metilmalónico>210 nmol/L

Tabla 2. Folato y Función Cognitiva. Estudios de Cohorte.

Autor # (Ref.)	Año Lugar	Cohorte (n)	Edad (años)	Seguimiento (años)	Rango Folatos	Rango H-C $\mu\text{mol/L}$	Rango Vit. B ₁₂ pg/ml	Pruebas de Evaluación Cognitiva
Kado (22)	2005 EEUU	499	70-79	7	Plasmáticos (ng/ml) 6,62 ($\pm 5,59$)	11,3 ($\pm 3,9$)	440,6 ($\pm 358,3$)	Habilidad Lenguaje Memoria de largo plazo Copia de figuras geométricas Reconocimiento a largo plazo Prueba de semejanza ^Δ
Morris (34)	2005 EEUU	3718	>65	6	Totales (\square g/día) 63-1719			EBMT* MMSE†† TSD** MMSE†† Prueba de Stroop
Mooijaart (32)	2005 Holanda	599	85	5	Séricos (nmol/L) 7,3-18,9	11,9-14,3	220-353	LCDT ^o Recuerdo de 12 Palabras
Tucker (33)	2005 EEUU	321	67 \pm 7	3	Plasmáticos 26 \pm 12 Totales (\square g/día) 440 \pm 202	11 \pm 5	335 \pm 136 Total (\square g/día) 9,57 \pm 5,73	MMSE †† Secuencia de dígitos inversa ^{ΔΔ}

								CERAD $\Delta\Delta\Delta$
					Séricos (ng/mL)			ETEC *** Boston ^{oo} Recuerdo diferido Fluidez verbal \diamond Recuerdo diferido ETEC***
Kang (36)	2006 EEUU	391	74	4	9,9 ‡		449 ‡	SDI ^{ooo}
					Intraeritrocitarios ng/ml			
					504,69	10,78	452,59	
					$\pm 159,89$	$\pm 6,46$	$\pm 203,49$	
Haan (35)	2007 EEUU	1779	60-101	4,5	(50-900)	(4-129,2)	(22-100)	3 MSE†

Primer autor

H-C= Homocisteína

*EBMT= Prueba de memoria inmediata y de recuerdo; **TSD=Test de Codificación de Símbolos y Dígitos; °LCDT Letter digit coding test =Prueba de codificación de dígitos; † 3 MSE=Mini-Examen del Estado Mental Modificado; †† MMSE= Mini-Examen del Estado Mental; ***Entrevista Telefónica del Estado Cognitivo; ^{ooo} SDI Secuencia de dígitos inversa; \diamond Fluidez verbal nombrando animales; Δ =Prueba de semejanza de la Escala de Wechsler; $\Delta\Delta$ =Secuencia de dígitos inversa de la Escala de Wechsler; $\Delta\Delta\Delta$ =Prueba de listado de palabras del Consorcio para Establecer un Registro para la Enfermedad de Alzheimer

‡ Valores promedios

Tabla 3. Folato y Función Cognitiva. Estudios Clínicos Randomizados.

Autor País Año/Ref	Vitaminas Dosis mg/día				Tiempo Prueba (meses)	Tipo Población (Edad)	Participantes n	Nivel Folatos \diamond	Pruebas de Evaluación Cognitiva
	A.F mg	B ₆ mg	B ₁₂ \square g	B ₂ mg					
Stott Escocia 2005 (42) Lewerin Suecia 2005 (43)	2,5	25	500	25	3	EVI* (>65años)	185 Plac=24 AF/B12=23 B2=23 B6=23 AF/B12+B6=23	Folato GR ng/ml 269±87 285±125	LDCT ** Entrevista telefónica del estado cognitivo Secuencia de dígitos progresiva e inversa Identificación formas Reproducción Visual de Sinónimos Diseño de bloques Digitación de Símbolos Thustone Clasificación de figuras Construcción Figura de Rey Secuencia de dígitos progresiva Planificación Motora 2 y Golpeteo de dedos para presionar un botón. Secuencias de
	0,8	3	500		4	Sanos (76 años)	Plac.=69 AF+B6+B12 =126	Folato Sérico nmol/L 16,4±5,1 15,7±6,1	
Eussen Holanda 2006 (39)	0,4		1000		6	Sanos o DCM y Déficit de Vit. B12	162 Vit B12=54 AF+B12=51 Plac=57	Folato GR ng/ml 578±172 591±203 680±280	

									dígitos inversa Similitud de Wais Raven Fluidez Palabras(animales) Fluidez Palabra,letras, N° y sustantivos Aprendizaje de palabras Desplazamiento conceptual Prueba de Stroop Fluidez verbal LCDT ** MMSE †† Prueba de Wechsler Test Fluidez Verbal Test Auditivo Verbal de Rey(I- V) Test Auditivo Verbal de Rey(VII) Matrices Progresivas de Raven Asociación Oral Palabras Parte B de la batería neuropsiquiátrica de Reitan Aprendizaje
Durga Holanda 2007 (38)	0,8			36	Sanos Cognición normal (50-70 años)	818 AF=405 PI=413		Folato Sérico nmol/L 12 (9-15) 12 (10-15)	
Mc Mahon Nueva Zelanda 2006 (40)	1	10	0,5	24		276 Suplementado con Vitaminas =127 P=126		Folato Plasmático ng/ml 10±5 10±5	
Ford	2	25	0,4	24	Cognición	299		Folato GR	

Australia 2010 (41)	normal Hombres Hipertensos	Suplementados con Vitaminas	nmol/L 647	verbal de California MMSE †† Cancelación de dígitos Dibujo del reloj Entrevista telefónica del Estado Cognitivo ADAS ‡
---------------------------------	----------------------------------	--------------------------------	---------------	---

Primer autor

◇ Niveles al inicio del estudio

Supl.= Sujetos que recibieron suplementos de vitaminas; A.F.= Acido Fólico; Plac.= Placebo; GR= Glóbulo Rojo

DCM= Déficit cognitivo moderado * EVI=Enfermedad Vasculiar Isquémica

** LCDT Letter digit coding Test (Prueba de sustitución de dígitos por letras).

‡ ADAS Escala de la sección cognitiva para Enfermedad de Alzheimer

†† MMSE = Mini-Examen del Estado Mental

Manuscrito IV

Castillo-Lancellotti C, Tur Marí JA, Uauy Dagach R.

**Folic acid supplementation and colorrectal adenoma recurrence:
systematic review.**

Nutr Hosp 2012;27(1):13-21.

Revisión Sistemática: Suplementación con ácido fólico y prevención de recurrencia de adenomas colorectales

Cecilia Castillo-L¹, Josep A. Tur¹, Ricardo Uauy²

¹Grup de Recerca en Nutrició Comunitària i Estrès Oxidatiu, Dept. de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears. 07122 Palma de Mallorca. España.

²Unidad de Salud Pública y Nutrición, Laboratorio de Epidemiología Molecular. Instituto de Nutrición y Tecnología en Alimentos, Universidad de Chile. Santiago de Chile.

Correspondencia a: Dra. Cecilia Castillo L. Avda. Salvador 100 2º Piso, Providencia, Santiago de Chile.

Fono 56-2-3662000

Correo: dracastillo@gmail.com

Recuento de Palabras: 3691

Resumen

Antecedentes: Estudios observacionales muestran que los niveles de folatos podrían estar asociados con el desarrollo de adenomas y cáncer colorrectal, sugiriendo que la suplementación de ácido fólico podría tener un efecto preventivo.

Objetivo: Revisar sistemáticamente la evidencia científica proveniente de estudios clínicos randomizados con placebo y controlados que permitan conocer los efectos de la suplementación del ácido fólico sobre la recurrencia de adenomas colorrectales.

Material y Método: Revisión sistemática en Medline, vía Pubmed de estudios clínicos randomizados, con placebo y controlados a doble ciego y sus referencias, que evalúen específicamente el efecto de la suplementación de ácido sobre la recurrencia de adenomas colorrectales

Resultados: Siete estudios clínicos randomizados que cumplieran los criterios de inclusión fueron seleccionados y evaluados.

Conclusión: Los estudios seleccionados no permiten concluir que la suplementación de ácido fólico tenga un efecto beneficioso sobre la recurrencia de adenomas colorrectales. Se observa en algunos estudios diferencias de riesgo según tipo de folatos que sugieren revisar los criterios y niveles de suplementación en algunos subgrupos de población con mayores riesgos.

Palabras claves: folato, ácido fólico, adenoma colorrectal, revisión sistemática.

Folate and colorectal adenoma recurrence. Systematic Review

Abstract

Background: Observational studies show that folate levels may be associated with the development of adenomas and colorectal cancer, suggesting that folic acid supplementation may have a preventive effect.

Aim: Systematic review of scientific evidence from randomized placebo-controlled clinical studies to identify the effects of folic acid supplementation on the recurrence of colorectal adenomas.

Material and methods: Medline, via Pubmed, systematic via Pubmed of randomized clinical trials, double-blind and placebo-controlled and references, specifically to evaluate the effect of acid supplementation on the recurrence of colorectal adenomas.

Results: Seven randomized clinical trials that met the inclusion criteria were selected and evaluated for analysis based on pre established criteria.

Conclusions: The selected studies do not support that folic acid supplementation is beneficial in recurrence of colorectal adenomas. We observed in some studies differences in risk by type of folate suggesting to review the criteria and levels of supplementation in some population subgroups with higher risks.

Key words: folate, folic acid, colorectal adenoma, systematic review.

Abreviaciones

ADN Ácido desoxiribonucleico

CASPe Critical Appraisal Skills Programme

CU Colitis ulcerosa

DDR Dosis diaria recomendada

DTN Defectos del tubo neural

MESH Medical Subject Headings(“descriptores de ciencias de la salud”)

MTHFR Metilén-tetrahidro-folato-reductasa

MTRR Metionina-sintetasa reductasa

SAM S-adenosil-metionina

5-MTHF 5-Metil-tetrahidrofolato

Introducción

La gran oferta de alimentos de consumo masivo fortificados con diversos nutrientes, así como el uso de vitaminas a través de suplementos ha generado preocupación a nivel internacional por la existencia de una mayor probabilidad de efectos adversos en salud cuando su consumo excede ciertos niveles establecidos(1). Desde el punto de vista de salud pública esta mayor preocupación se fundamenta en la necesidad de identificar de forma precoz efectos adversos en distintas poblaciones y sub-poblaciones en muchos de los países que han establecido fortificaciones obligatorias de alimentos(2). Este monitoreo permitiría limitar eventuales riesgos asociados, así como también, efectuar una oportuna adecuación y modificación de este tipo de intervenciones nutricionales.

Dentro de estas fortificaciones mandatorias destaca la adición de ácido fólico en toda la harina de trigo. Esta política de intervención nutricional fue implementada en la década de los 90 por numerosos países como Estados Unidos, Canadá y Chile entre otros(3), siendo su principal objetivo aumentar la ingesta de folatos en la mujer embarazada, a través de la ingesta del ácido fólico(4), un folato sintético que permitiría en forma específica, reducir el número de recién nacidos con defectos del tubo neural (DTN)(5), medida que una vez implementada ha demostrado, en numerosas evaluaciones, ser altamente costo-efectiva(6).

Los folatos han sido relacionados con un amplio rango de efectos beneficiosos en salud entre los que destacan la prevención de enfermedades vasculares y neurológicas como el accidente vascular cerebral(7), la enfermedad de Alzheimer(8), así como también, un menor riesgo de cáncer colorrectal(9). Los primeros efectos beneficiosos del ácido fólico en relación a colon fueron descritos en pacientes portadores de colitis ulcerosa (CU), en quienes se describía un mayor riesgo para desarrollar cáncer de colon. En estos pacientes se observaba una baja concentración sérica de folatos secundario al uso de la sulfalazina, una droga con efecto antagónico al folato utilizada en su tratamiento, lo que se sumaba a una inadecuada ingesta dietaria y a las pérdidas intestinales producidas por la inflamación que acompaña a esta enfermedad(10). Numerosos estudios han descrito una relación entre consumo de folatos, desarrollo de adenomas y cáncer colorrectal, sugiriendo que existiría una reducción del riesgo relativo entre un veinte a cuarenta por ciento en individuos con ingestas elevadas de

folatos(11).

Sin embargo, otros estudios publicados posteriormente han mostrado un efecto diferente al descrito anteriormente, sugiriendo la existencia de un posible efecto adverso del folato en el desarrollo de cáncer colorrectal (12). Al parecer, este nutriente podría jugar un doble rol, por una parte protegería contra la iniciación del cáncer en sujetos con bajos niveles de folato sérico, pero también podría facilitar el crecimiento de lesiones preneoplásicas cuando los niveles séricos son elevados(13). Este mayor riesgo, especialmente asociado al consumo de ácido fólico sintético, dependería del nivel de ingesta, del grupo étnico, de la condición de salud previa y de las características genéticas de los individuos entre otras variables(14).

Las poblaciones que reciben ácido fólico provenientes de alimentos fortificados muestran un importante aumento en sus niveles de folato sérico, no sólo en las mujeres jóvenes, el principal grupo objetivo de la fortificación de la harina con ácido fólico, sino también en toda la población que consume harina de trigo y alimentos derivados(15-17); unos niveles que, según algunos autores, podría determinar un mayor riesgo en salud en algunas subpoblaciones(12,18).

Se estima que muchos cánceres colorrectales se desarrollan a partir de un incremento en la proliferación celular de la mucosa colónica, seguida de la formación y crecimiento de un pólipo adenomatoso benigno que evoluciona hacia formas con altos grados de displasia, a partir de los cuales y tras un largo tiempo se desarrollaría el cáncer colorrectal(19). El número y el tamaño de adenomas, así como su tipo histológico también serían determinantes en la malignización(20). Considerando el largo proceso de desarrollo de este tipo de cáncer, se han evaluado numerosas drogas y nutrientes como una alternativa para prevenir el desarrollo de adenomas y de cáncer colorrectal. Dentro de ellos, la suplementación con ácido fólico se ha propuesto como un agente preventivo por su importante rol en la síntesis, estabilidad, integridad y reparación del ADN, cuyas alteraciones han sido implicadas en la carcinogénesis(21).

Considerando que numerosos países han establecido una fortificación de harina de trigo en forma mandatoria (22-25) que ha determinado un aumento importante en los niveles de folato sérico(15-17), hemos desarrollado la presente revisión sistemática con el objetivo de conocer los beneficios y riesgos de la suplementación con ácido

fólico en la recurrencia de adenomas colorrectales.

Material y Método

Para responder al objetivo de esta revisión sistemática se efectuó una búsqueda en revistas científicas en inglés y español provenientes de la base de datos Medline, vía Pubmed. Se utilizaron los siguientes descriptores de ciencias de la salud, “Medical Subject Headings” (MESH): ácido fólico y adenomas colorrectales y como segunda búsqueda específica se incluyó la palabra folato. Se encontraron 236 artículos potenciales de ser considerados, de los cuales se seleccionaron aquellos que incluían los siguientes criterios: estudios clínicos randomizados, a doble ciego, con placebo y controlados, en población adulta con una suplementación diaria de ácido fólico y cuyo objetivo principal era evaluar la recurrencia de adenomas o adenomas colorrectales avanzados. Considerando estos criterios de selección establecidos, dos investigadores independientes revisaron y excluyeron los artículos que no alcanzaban el umbral mínimo de calidad para su diseño según la versión española “Critical Appraisal Skills Programme” (CASPe) (26) y aquellos en que no se podía garantizar el control de los sesgos. De los 18 estudios potenciales a ser incluidos se seleccionaron exclusivamente aquellos que analizaban la administración diaria de ácido fólico, sin administración de otras vitaminas, con o sin suplementación de otros componentes (Figura 1). En total se seleccionaron siete artículos cuyas referencias asociadas fueron revisadas en forma manual para identificar otras publicaciones que cumplieran con los criterios de inclusión descritos anteriormente (Tabla 1 y 2).

Resultados

Un estudio desarrollado por Cole et al.(27) en nueve centros clínicos de Estados Unidos y Canadá (“The Aspirin/Folate Polyp Prevention Study”) que incluyó a 987 pacientes caucásicos que fueron randomizado usando un diseño factorial de 3x2 para recibir 1 mg diario de ácido fólico y aspirina (81 y 325 mg/día) o placebo no demuestra una disminución en el riesgo de ocurrencia de adenomas de colon durante los tres primeros años de observación (RR=1.04; IC;95% 0.9-1.2 P 0.58). Tampoco se observó algún efecto significativo controlando por edad, sexo, tabaco, consumo de

alcohol, índice de masa corporal folato plasmático basal o uso de aspirina. En los que recibieron suplemento de ácido fólico, en el segundo período de evaluación (3-6 años) se observa un 67% de aumento de adenomas con lesiones avanzadas con un alto potencial de malignización definidos como adenomas túbulo-vellosos (25-75% de hallazgos vellositarios; adenomas vellosos \geq 75% hallazgos vellositarios; tamaño \geq de 1 centímetro o adenomas con alto grado de displasia o invasivos)(RR=1.67 IC;95% 1-2.8 P 0.05). También se observa un mayor número de desarrollo de adenomas (\geq 3) siendo este resultado significativamente diferente a lo observado en el primer período de estudio (RR=2.3 IC; 95% 1.23-4.35).

Otros estudio randomizado que utilizó posteriormente los mismos datos del estudio anterior pero que evaluó si la asociación entre la suplementación con ácido fólico y el desarrollo de adenomas colorrectales variaba cuando se consideraba el nivel de folato dietario y los niveles circulantes de folato, describe que al final del primer período de seguimiento (3 años) se observa un pequeño, aunque no significativo incremento del riesgo, asociado al tratamiento de ácido fólico. La diferencia del riesgo relativo es significativa (P interacción=0.01) cuando se compara los individuos ubicados en el tercil superior de ingesta basal de folato total (RR=1.46 IC;95%1.12-1.89) versus aquellos del tercil inferior de ingesta (RR=0.85 IC;95% 0.67-1.09). En el segundo período de seguimiento (3 a 6 años) no se observó ninguna asociación con folatos basales. Al hacer la comparación entre el grupo que recibe ácido fólico y el grupo placebo, se observa un efecto significativamente protector para el desarrollo de adenomas colorrectales en los sujetos del grupo placebo ubicados en el nivel más elevado (tercil superior) de ingesta de folato total (RR=0.69 IC;95%0.51-0.94 P 0.01), así como también de folato circulante (RR=0.72 IC;95% 0.54-0.97 P 0.03), pero no así en los suplementados. Sin embargo, en el segundo período de estudio, se observa un significativo mayor riesgo en los sujetos con mayores niveles de folatos eritrocitarios que reciben placebo (RR=1.55 IC;95%1.08-2.24 P0.02) y una significancia límite en aquellos perteneciente al tercil superior de ingesta de folato dietario que recibieron suplementación de ácido fólico (RR=1.57 IC;95% 0.99-1.89 P0.05)(28).

Logan et al. (29) en un estudio clínico multicéntrico desarrollado en Inglaterra y Dinamarca (“ukCAP Study”), en pacientes menores de 75 años, cuyo objetivo era determinar si el tratamiento con 0.5 mg de ácido fólico o con adición de 300 mg/día de

aspirina podía reducir la recurrencia de adenomas, no muestra en ninguno de los grupos tras 3 años de suplementación, una reducción en el riesgo de recurrencia de adenomas colorrectales cuando éstos eran comparados con los sujetos que recibían sólo aspirina o sólo placebo (RR=1.07 IC;95% 0.85-1.34); sin embargo, un 21% de los que recibieron aspirina presentaron una reducción en el número de adenomas.

A diferencia de los estudios anteriores, un pequeño estudio clínico en 49 sujetos (30) describe que tras tres años de suplementación con 5 mg/día de ácido fólico se observa un menor número de adenomas (0.36 ± 0.69 DE) cuando se compara con los 45 sujetos que recibieron placebo (0.82 ± 1.17 DE). En este estudio se observa que la recurrencia de adenomas a los 3 años de seguimiento fue dos veces mayor en el grupo placebo que en el grupo suplementado, no observándose diferencias en la recurrencia de pólipos hiperplásticos, a excepción del grupo de sujetos mayores de 70 años tratados con ácido fólico que mostraron un aumento no significativo en la recurrencia de adenomas colorrectales.

Un estudio clínico publicado en el año 2009 y desarrollado en 338 pacientes entre 50 y 78 años provenientes de 2 cohortes de Estados Unidos que recibieron 1 mg/día de ácido fólico (31) muestra que, después de tres años de suplementación, no se observa un efecto protector en la recurrencia de adenomas colorectales (RR=0.87 IC;95% 0.56-1.16), pero sí muestra beneficios en sujetos con bajos niveles séricos de folatos ≤ 7.5 ng/ml (RR=0.61 IC;95% 0.42-0.9 P0,01) y en aquellos además con un consumo de alcohol superior a 5,6 g/día (RR=0.49 IC 95% 0.28-0.84 P0.009).

La existencia de polimorfismos en algunos genes de las enzimas participantes en el ciclo del folato genera una enzima con capacidad reducida, alterando la síntesis de ADN y la metilación de los genes. Dentro de los estudios randomizados seleccionados, el polimorfismo 677 C>T y el 1298 A> de la Metilén-tetrahidro-folato-reductasa(MTHFR) y su relación con la recurrencia de adenomas colorrectales son evaluados en dos de los ensayos clínicos seleccionados. En el estudio de Levine et al. (32) se describe que la suplementación de 1 mg de ácido fólico diario, durante al menos 5 años de seguimiento, no influye en la recurrencia de adenomas o de adenomas avanzados cuando se considera cualquiera de los genotipos mencionados anteriormente, ya sean homocigotos o heterocigotos para el alelo salvaje o cuando se consideran los genotipos combinados de ambos polimorfismos C677T/A1298C.

A diferencia de lo descrito anteriormente (32), otro estudio que analizó datos provenientes del ensayo clínico “Aspirin/Folate Polyp Prevention Study” desarrollado para evaluar recurrencia de adenomas suplementados con 0.5 mg diario de ácido fólico, pero que consideró la existencia de diferentes polimorfismos en los sujetos estudiados, sugiere que algunos podrían jugar un rol en el riesgo de recurrencia de los adenomas colorrectales. En los pacientes heterocigotos para el polimorfismo de la enzima Metionina-sintetasa reductasa (MTRR A66G), se observa una reducción significativa del riesgo cuando son suplementados con ácido fólico (RR=0.53 IC 95% 0.34-0.83). En cambio, en los sujetos heterocigotos para la MTHFR C677T la reducción del riesgo no alcanza a ser estadísticamente significativa (RR=0.92 IC;95% 0.6-1.12) (33).

Discusión

En Europa el cáncer colorrectal representa el 13.6% de todos los cánceres y corresponde a la segunda causa de muerte por esta patología(34). En España es el segundo tumor de mayor incidencia(35) y en Chile es la tercera causa de muerte después de los cánceres gástrico y biliar(36). La existencia de una serie de publicaciones que describen una asociación temporal entre el desarrollo de cáncer colorrectal, en algunos grupos de población e ingestas elevadas de folatos, después de la fortificación mandataria de harina de trigo con ácido fólico(37,38) parece importante de ser considerada y evaluada dado el aumento de folatos séricos observados en las poblaciones de los países con fortificación obligatoria de ácido fólico(22-25). Considerando además, la existencia de una asociación entre la presencia de adenomas colorectales y el desarrollo de cáncer colorrectal(19,39), se ha efectuado la presente revisión sistemática como una forma de conocer si la suplementación con ácido fólico en diferentes dosis y por tiempos determinados influye en la reducción o en el desarrollo de adenomas colorrectales en sujetos con antecedentes previos de esta patología. Estos ensayos clínicos semejan de algún modo, el efecto que tendría la fortificación de alimentos en un porcentaje importante de sujetos con adenomas colorrectales o con lesiones avanzadas, cuyos resultados pueden orientar acerca de los beneficios o riesgos de esta intervención masiva, aún cuando la intervención en este tipo de estudios es por un tiempo limitado.

Estudios epidemiológicos retrospectivos, prospectivos y metanálisis muestran la existencia de una asociación inversa entre una ingesta elevada de folatos y el riesgo para

desarrollar adenomas y cáncer colorrectal (9,40-43). Por otra parte, estudios en modelos de ratas genéticamente predisuestas a desarrollar tumores muestran un aumento de pólipos colorrectales, asociados a lesiones microscópicas preestablecidas cuando su alimentación es suplementada con ácido fólico(44-46). Sin embargo, cuando el aporte ocurre antes de la aparición de neoplasias se observa un menor desarrollo posterior de cáncer colorrectal (45), observándose incluso en algunos de estos casos una regresión de pólipos ileales(46). Concordante con estos resultados en modelos animales, un estudio anidado en una cohorte sueca describe un potencial mayor riesgo para desarrollar cáncer colorrectal asociado a altos niveles de folato sérico, describiendo un riesgo en forma de campana que sugiere que bajos niveles de folato sérico inhibirían la carcinogénesis y que altos niveles podrían promoverla (46). Este mayor riesgo en salud ha sido descrito en algunos estudios que evalúan la relación entre niveles elevados de folatos y cáncer de mama(47) y velocidad de deterioro cognitivo en el adulto mayor (48) sugiriendo la existencia de un efecto dual en sus funciones, donde un adecuado aporte contribuiría a la estabilidad genética, pero que a su vez, podría facilitar la expansión de cáncer cuando existen lesiones preneoplásicas, sugiriendo que tanto la dosis, como el tiempo de suplementación con ácido fólico son variables importantes de considerar cuando se quiere analizar y comparar el efecto de la suplementación (49)(Figura 2).

Del total de ensayos clínicos revisados, sólo uno efectuado en población norteamericana y canadiense muestra un aumento significativo de recurrencia de lesiones avanzadas después de cinco años de suplementación con 1 mg/día de ácido fólico, no observándose beneficios en sujetos consumidores de alcohol o fumadores, donde se ha descrito que la suplementación de ácido fólico tendría un efecto beneficioso (27). El aumento de riesgo en el desarrollo de adenomas con lesiones avanzadas, pero no en su número, podría explicarse porque al inicio del estudio, los individuos suplementados tenían un mayor número de adenomas de grosor ≥ 1 centímetro que los sujetos que recibieron placebo. Considerando la relación existente entre mayor tamaño del adenoma colorrectal y malignización, los resultados de este estudio podrían sugerir la existencia de una mayor predisposición a desarrollar lesiones avanzadas secundarias a la suplementación(50-51) o también podría ser explicado por la existencia de una vía independiente de folatos en personas con historia previa de adenoma(52). Concordante con los resultados de este estudio, un mayor riesgo, aunque no significativo, se observa en un pequeño ensayo

clínico en adultos mayores de 70 años suplementados con una dosis cinco veces mayor al límite superior establecido como dosis diaria recomendada (DDR) para ácido fólico (5 mg/día), sin embargo, considerando el limitado número total de sujetos participantes (n=94), este resultado debe ser observado con precaución(30).

Por otra parte, cuando en el análisis se considera en forma separada la ingesta de folatos dietarios y totales (dietarios más suplementados), se puede observar que la disminución del riesgo aparece como significativa solo para la ingesta de folatos dietarios (50,51), de manera similar a las conclusiones derivadas de un metanálisis desarrollado por San Joaquín et al.(44). Una explicación a esta diferencia podría ser dada porque los folatos contenidos en la dieta interactúan con otros componentes de los alimentos o bien podría estar relacionado con la limitada reducción enzimática del ácido fólico durante la absorción intestinal, que es dosis dependiente y que determina de esta manera, una mayor biodisponibilidad, así como su aparición en la circulación, en una forma sin metabolizar cuando la ingesta es cercana a los 300 mg/d(52).

El estudio desarrollado por Figueiredo et al.(28) utilizando los datos del ensayo clínico publicado por Cole et al.(27), pero controlando la recurrencia de adenomas según folato dietario y niveles circulantes de folatos muestra un efecto significativamente protector para el desarrollo de adenomas en aquellos pertenecientes al grupo placebo con el nivel más elevado (tercil superior) de ingesta de folato total, pero no así en los suplementados lo que podría sugerir que dosis moderadas de folatos podrían disminuir la recurrencia de adenomas colorrectales cuando existe deficiencia, sin embargo, en algún punto esta suplementación podría no determinar beneficios adicionales(Figura 2).

Se ha postulado que altos niveles de suplementación de ácido fólico permitirían aportar los nucleótidos que las células neoplásicas requieren para su rápida replicación y crecimiento(53). También se estima que el ácido fólico podría contribuir a la metilación “*de novo*” en las zonas denominadas islas citosina-guanina (CpG) de la región promotora de los genes supresores de tumores, los que se encuentran habitualmente sin metilar. Esta metilación tendría efectos en la configuración y en la estabilidad estructural del ADN que determinaría el silenciamiento de estos genes favoreciendo el crecimiento tumoral(54,55).

Otros estudios, como el ensayo clínico desarrollado en Inglaterra y Dinamarca (ukCAP) utilizando una dosis de ácido fólico de 0,5 mg/día cercana a la dosis diaria recomendada para este nutriente (0.4 mg/día) (31) y similar a los niveles de fortificación utilizados en algunos alimentos de los Estados Unidos previo a la fortificación obligatoria de harina, no describe una mayor recurrencia de adenomas colorrectales, indicando que esta dosis no presentaría efectos adversos en recurrencia de adenomas y en la incidencia de cáncer colorrectal. A diferencia de este estudio, Wu K et al.(31) encuentra, al igual que en otros modelos de estudio, un efecto preventivo de la suplementación, cuando los individuos presentan bajos niveles de folatos séricos y un alto consumo de alcohol(56,57). La heterogeneidad de los resultados indica la necesidad de desarrollar investigaciones con diseños que tengan suficiente poder estadístico, que permitan un adecuado análisis por subgrupos, así como también, la evaluación del efecto de diferentes tipos de folatos y niveles de consumo de alcohol, en el desarrollo de adenomas colorrectales.

Es importante considerar, que muchos de los estudios revisados, se desarrollaron en un período cercano al inicio de la fortificación de alimentos con ácido fólico en los Estados Unidos que podría haber limitado una adecuada comparación con los grupos que recibieron placebo considerando el aumento de folato sérico que se observa en toda la población(24).

Por otra parte, se debe tener presente que el adecuado funcionamiento del metabolismo del folato depende de una serie de enzimas que participan en su ciclo. En algunos individuos estas funciones pueden verse alteradas por la existencia de polimorfismos en algunos de los genes que codifican estas enzimas y que determinan cambios en sus mecanismos de acción. Unos de los polimorfismos más estudiados son los relacionados con la enzima MTHFR, cuya función en el ciclo del folato es clave porque cataliza la conversión irreversible de 5-10 Metilen-tetrahidrofolato a 5-Metil-tetrahidrofolato(5-MTHF), permitiendo una adecuada provisión de nucleótidos, de síntesis de ADN, así como, la provisión de S-adenosil-metionina (SAM) necesaria para las reacciones de metilación. La frecuencia del alelo mutante 677T de la MTHFR varía según las distintas poblaciones lo que podría tener enormes implicancias clínicas en la modulación del cáncer colorrectal(58). Sin embargo, las conclusiones provenientes de los ensayos clínicos seleccionados en esta revisión que incorporan en el análisis la

presencia de estos polimorfismos no son concluyentes. Hubner et al, describe en el caso del polimorfismo de la enzima Metionina-sintetasa-reductasa(MTRR A66G) un efecto preventivo en la recurrencia de adenomas para individuos heterocigotos, en cambio Levine et al.(32) no describe ninguna asociación en relación a diferentes polimorfismos. Los mecanismos a través de los cuales el polimorfismo de la MTHFR C677T y la suplementación de folatos puede modular el riesgo de cáncer colorrectal no han sido bien establecidos. Se estima que cuando la provisión de folato y otros nutrientes relacionados son elevados, estos sujetos podrían tener un menor riesgo, ya que una adecuada ingesta limitaría el desbalance en la síntesis de nucleótidos que aseguraría una adecuada replicación del ADN. En cambio, un déficit de folatos disminuiría la provisión de 5-MTHF, la síntesis y reparación de ADN, que podría constituir un mecanismo primario para la carcinogénesis(12). Los resultados de estos ensayos clínicos sugieren la necesidad de incluir en futuros análisis del efecto de la suplementación de ácido fólico en la recurrencia de adenomas colorrectales, la relación existente con los polimorfismos de las enzimas del ciclo del folato. Su existencia, así como la interacción que puede existir entre diversos genes, deben ser consideradas para contribuir a determinar el real impacto de la suplementación de ácido fólico en diferentes subgrupos de poblaciones(58).

En conclusión, los resultados de los ensayos clínicos randomizados a doble ciego seleccionados en esta revisión sistemática a partir del año 2005, no permiten concluir que la suplementación de ácido fólico tenga un efecto beneficioso en la recurrencia de adenomas colorrectales. La existencia de probables diferencias en el riesgo según tipo de folatos sugerida en algunos de estos estudios, hace necesario revisar los criterios y niveles de suplementación de ácido fólico en algunos subgrupos de población que pudieran tener mayores riesgos para desarrollar adenomas y cáncer colorrectal.

Referencias

1. A Model for Establishing Upper Levels of Intake for Nutrients and Related Substances Report of a Joint FAO/WHO Technical Workshop on Nutrient Risk Assessment WHO Headquarters, Geneva, Switzerland 2-6 May 2005.
2. Allen L, Benoist B, Dary O, Hurrell R. Guidelines on food fortification with micronutrients. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006.
3. Dary O. Nutritional interpretation of folic acid interventions. *Nutr Rev.* 2009;67(4):235-44.
4. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary reference intakes:thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenicacid, biotin, and choline. A Report of the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary References Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins and Choline and Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients. Washington, DC: National Academy Press, 1998.
5. Moore LL, Bradlee ML, Singer MR, Rothman KJ, Milunsky A. Folate intake and the risk of neural tube defects: an estimation of dose-response. *Epidemiology* 2003;14(2):200-5.
6. Llanos A, Hertrampf E, Cortes F, Pardo A, Grosse SD, Uauy R. Cost-effectiveness of a folic acid fortification program in Chile. *Health Policy* 2007;83(2-3):295-303.
7. Wang X, Qin X, Demirtas H, Li J, Mao G, Huo Y, et al. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis *Lancet* 2007 ;369(9576):1876-82.
8. Fuso A, Scarpa S. One-carbon metabolism and Alzheimer's disease: is it all a methylation matter? *Neurobiol Aging.* 2011;32(7):1192-5.
9. Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Fuchs C, Rosner BA, et al. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. *Ann Intern Med.* 1998 ;129(7):517-24.
10. Lashner BA, Provencher KS, Seidner DL, Knesebeck A, Brzezinski A. The effect of folic acid supplementation on the risk for cancer or dysplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997;112(1):29-32.

11. Kune G, Watson L. Colorectal cancer protective effects and the dietary micronutrients folate, methionine, vitamins B6, B12, C, E, selenium, and lycopene. *Nutr Cancer*. 2006;56(1):11-21.
12. Kim YI Folate and colorectal cancer: An evidence-based critical review. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51(3):267-92.
13. Lucock M, Yates Z. Folic acid fortification: a double-edged sword. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009;12(6):555-64.
14. Ulrich CM, Potter JD. Folate supplementation: too much of a good thing? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15 (2):189-93
15. Quinlivan EP, Gregory JF 3rd. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr* 2003;77 (1):221-5.
16. Hertrampf E, Cortés F, Erickson JD, Cayazzo M, Freire W, Bailey LB, Howson C, Kauwell GP, Pfeiffer C. Consumption of folic acid-fortified bread improves folate status in women of reproductive age in Chile. *J Nutr* 2003;133(10):3166-9.
17. Hirsch S, de la Maza P, Barrera G, Gattás V, Petermann M, Bunout D. The Chilean flour folic acid fortification program reduces serum homocysteine levels and masks vitamin B-12 deficiency in elderly people. *J Nutr* 2002;132(2):289-91.
18. Selhub J, Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH. Folate-vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. *Am J Clin Nutr*. 2009; 89 (2): 702S-6S
19. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361(25): 2449-60
20. Atkin WS, Saunders BP; British Society for Gastroenterology; Association of Coloproctology for Great Britain and Ireland. Surveillance guidelines after removal of colorectal adenomatous polyps. *Gut*. 2002; 51 Suppl 5:V6-9.
21. Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: Molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(8): 601–614
22. Castillo C, Tur JA, Uauy R. Flour fortification with folic acid in Chile. Unintended consequences. *Rev Med Chil* 2010;138(7):832-40.
23. Ray Jg, Vermeulen Mj, Boss Sc, De. C. Declining rate of folate insufficiency among adults following increased folic acid food fortification in Canada. *Can J Public Health* 2002;93: 249-253.

24. Choumenkovitch Sf, Selhub, Wilson Pf, Rader Ji, Rosenberg Ih, Jacques P. Folic acid intake from fortification in United States exceeds predictions. *J Nut.*2002;132:2792-2798.
25. Brown RD, Langshaw MR, Uhr EJ, Gibson JN, Joshua DE. The impact of mandatory fortification of flour with folic acid on the blood folate levels of an Australian population. *Med J Aust.* 2011;194 (2):65-7.
26. CASPe (2011) Critical Appraisal Skills Programme Español (CASPe) [homepage]. Alicante, Spain: CASPe; (Consultado el 1 de marzo de 2011). Disponible en <http://www.redcaspe.org>
27. Cole BF, Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Ahnen DJ, Bresalier RS, et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2007 6;297 (21):2351-9.
28. Figueiredo JC, Levine AJ, Grau MV, Barry EL, Ueland PM, Ahnen DJ, et al. Colorectal adenomas in a randomized folate trial: the role of baseline dietary and circulating folate levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(10):2625-31.
29. Logan RF, Grainge MJ, Shepherd VC, Armitage NC, Muir KR; ukCAP Trial Group. Aspirin and folic acid for the prevention of recurrent colorectal adenomas. *Gastroenterology.* 2008;134(1):29-38.
30. Jaszewski R, Misra S, Tobi M, Ullah N, Naumoff JA, Kucuk O, et al. Folic acid supplementation inhibits recurrence of colorectal adenomas: a randomized chemoprevention trial. *World J Gastroenterol.* 2008;14(28):4492-8.
31. Wu K, Platz EA, Willett WC, Fuchs CS, Selhub J, Rosner BA, et al. A randomized trial on folic acid supplementation and risk of recurrent colorectal adenoma. *Am J Clin Nutr.* 2009 ; 90(6):1623-31.
32. Levine AJ, Wallace K, Tsang S, Haile RW, Saibil F, Ahnen D, et al. MTHFR genotype and colorectal adenoma recurrence: data from a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(9):2409-15.
33. Hubner RA, Muir KR, Liu JF, Sellick GS, Logan RF, Grainge M, et al. Folate metabolism polymorphisms influence risk of colorectal adenoma recurrence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15 (9):1607-13.
34. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008 *Eur J Cancer.* 2010;46 (4):765-81.

35. Cabanes A, Vidal E, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Lope V et al. Cancer mortality trends in Spain: 1980-2007. *Ann Oncol.* 2010; 21 Suppl 3:iii14-20
36. Ministerio de Salud de Chile(MINSAL). Departamento de Epidemiología. Vigilancia No Transmisibles. Registros de Cáncer. Disponible en: <http://epi.minsal.cl/epi/html/frames/frame2.htm> Consultado el 29 de mayo de 2011.
37. Mason JB, Dickstein A, Jacques PF, Haggarty P, Selhub J, Dallal G et al. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(7):1325-9.
38. Hirsch S, Sanchez H, Albala C, de la Maza MP, Barrera G, Leiva L et al. Colon cancer in Chile before and after the start of the flour fortification program with folic acid. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21(4):436-9.
39. Kim YI. Folic acid supplementation and cancer risk: point. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 ;17(9):2220-5.
40. Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. A prospective study of dietary folate intake and risk of colorectal cancer: modification by caffeine intake and cigarette smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(3):740-3.
41. Giovannucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *J Nutr.* 2002;132(8 Suppl):2350S-2355S.
42. Sanjoaquin MA, Allen N, Couto E, Roddam AW, Key TJ. Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Int J Cancer.* 2005;113 (5):825-8.
43. Van Guelpen B, Hulthén J, Johansson I, Hallmans G, Stenling R, Riboli E et al. Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut* 2006;55(10):1387-9.
44. Song J, Medline A, Mason JB, Gallinger S, Kim YI. Effects of dietary folate on intestinal tumorigenesis in the *apcMin* mouse. *Cancer Res.* 2000;60(19):5434-40.
45. Song J, Sohn KJ, Medline A, Ash C, Gallinger S, Kim YI. Chemopreventive effects of dietary folate on intestinal polyps in *Apc^{+/-}-Msh2^{-/-}* mice. *Cancer Res.* 2000;60(12): 3191-9.
46. Bashir O, FitzGerald AJ, Goodlad RA. Both suboptimal and elevated vitamin intake increase intestinal neoplasia and alter crypt fission in the *ApcMin/+* mouse. *Carcinogenesis.* 2004; 25(8):1507-15.

47. Stolzenberg-Solomon RZ, Chang SC, Leitzmann MF, Johnson KA, Johnson C, Buys SS, et al. Folate intake, alcohol use, and postmenopausal breast cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Am J Clin Nutr* 2006;83(4):895-904
48. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(6):1733-44)
49. Mason JB. Folate, cancer risk, and the Greek god, Proteus: a tale of two chameleons. *Nutr Rev*. 2009;67(4):206-12.
50. Martínez ME, Henning SM, Alberts DS. Folate and colorectal neoplasia: relation between plasma and dietary markers of folate and adenoma recurrence. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(4):691-7.
51. Martínez ME, Giovannucci E, Jiang R, Henning SM, Jacobs ET, Thompson P, et al. Folate fortification, plasma folate, homocysteine and colorectal adenoma recurrence. *Int J Cancer*. 2006; 119(6):1440-6.
52. Sweeney MR, McPartlin J, Scott J. Folic acid fortification and public health: report on threshold doses above which unmetabolised folic acid appear in serum. *BMC Public Health* 2007; 7:41
53. Kim YI. Folic acid supplementation and cancer risk: point. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2008; 17 (9): 2220–2225.
54. van Engeland M, Herman JG. Viewing the epigenetics of colorectal cancer through the window of folic acid effects. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3(12):1509-12.
55. Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG. Diet-induced hypermethylation at agouti viable yellow is not inherited transgenerationally through the female. *FASEB J*. 2007; 21(12): 3380-5.
56. Boyapati SM, Bostick RM, McGlynn KA, Fina MF, Roufail WM, Geisinger KR, et al. Folate intake, MTHFR C677T polymorphism, alcohol consumption, and risk for sporadic colorectal adenoma (United States). *Cancer Causes Control*. 2004;15(5):493-501.
57. La Vecchia C, Negri E, Pelucchi C, Franceschi S. Dietary folate and colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2002;102(5):545-7.
58. Mayor-Olea A, Callejón G, Palomares AR, Jiménez AJ, Gaitán MJ, Rodríguez A, et

al. Human genetic selection on the MTHFR 677C>T polymorphism. BMC Med Genet. 2008; 9:104.

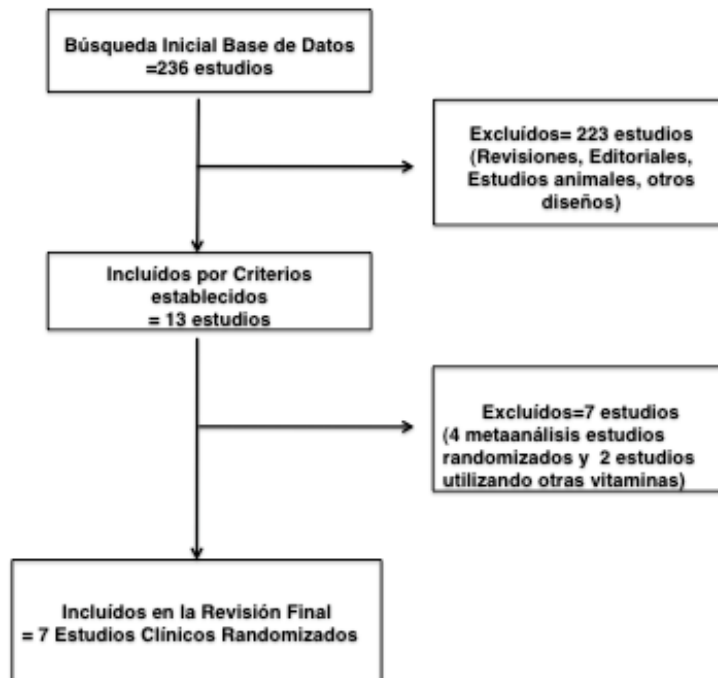


Figura 1. Flujograma de los artículos incluidos y excluidos en la Revisión Sistemática

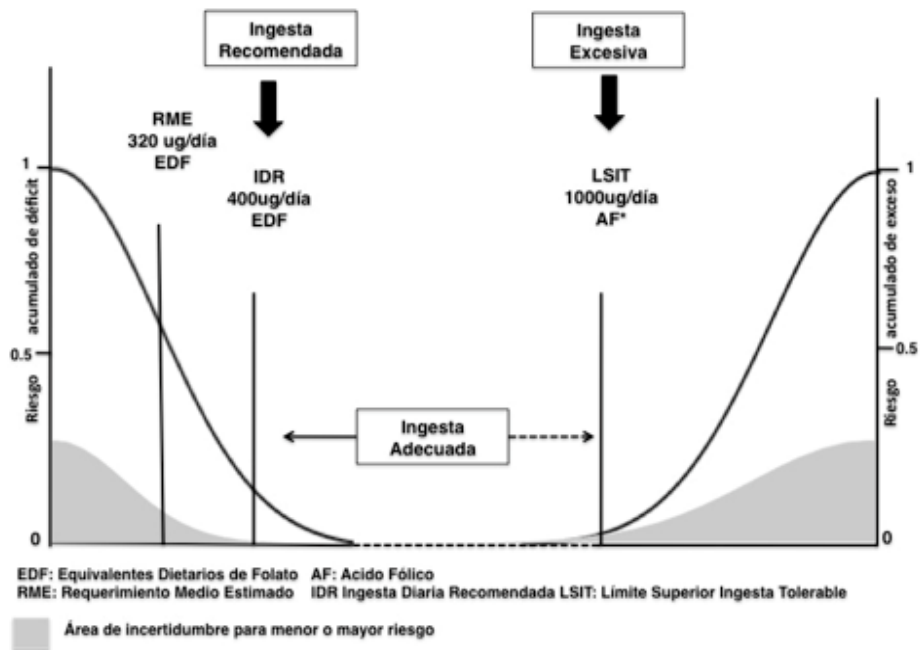


Figura 2. Modelo para ilustrar la relación entre ingesta de folatos y riesgos para la salud

Tabla 1. Estudios clínicos que evalúan la asociación entre recurrencia de adenomas colorrectales y suplementación con ácido fólico.

Autor País Año Ref.#	Nº Sujetos Suplement ados /Placebo	Ácido Fólico Dosis Diaria (mg)	Duración	Recurrencia de adenomas	RR	IC (95%)	P Tend (Int)	Resultados
Cole EEUU 2007 (27)	516/505	1	3 años	1 -2	1,0	(0,85-1,19)	0,66	<i>La suplementación de ácido fólico no reduce el riesgo de recurrencia de adenoma colorectal. Después de 5 años se observa un mayor riesgo de adenomas y de lesiones avanzadas</i>
				≥ 3	1,2	(0,8-1,81)	0,15	
				Lesión avanzada	1,32	(0,9-1,92)		
				5 años	1 -2	0,97	(0,77-1,22)	
				≥ 3	2,32	(1,23-4,35)		
				Lesión avanzada	1,67	(1-2,8)	0,05	
Logan Inglaterra 2008 (29)	706°/233	0,5	3 años	De algún adenoma Adenoma Avanzado	1.07 0,98	(0,85-1,34) 0,68-1,4)	0,58 0,89	<i>El ácido fólico no reduce el riesgo de recurrencia de adenoma colorectal.</i>
Jaszewski EEUU 2008 (30)	80/97	5	3 años	Recurrencia de Adenomas	0,44	(0,24-0,83)		<i>La suplementación con altas dosis de ácido fólico se asocia con una reducción significativa de adenomas de colon.</i>

Autor País Año Ref.#	Nº Sujetos Suplement ados /Placebo	Ácido Fólico Dosis Diaria (mg)	Duración	Recurrencia de adenomas	RR	IC (95%)	P	Resultados
Figuereido EEUU 2008 (28)	516/505 §	1	3 años	§ Folato Dieta †		*		<i>Una dosis moderada de folatos puede ser protectora cuando se compara con la existencia de una deficiencia. Se estima que en algún punto la suplementación no proporciona beneficios adicionales</i>
				Placebo	0,87	(0,67-1,11)	0,26	
				Acido Fólico	0,93	(0,72-1,21)	0,6	
				Folato Total ††				
				Placebo	0,69	0,51-0,94	0,01	
				Ácido Fólico	1,18	(0,88-1,59)	0,44	
Wu EEUU 2009 (31)	338/334	1	3-6,5	Folato Dieta †				<i>No se observa un efecto protector de la suplementación de ácido fólico en la recurrencia de adenomas. Esta puede ser beneficiosa en sujetos con bajo nivel de folatos basales</i>
				Placebo	1,12	(0,8-1,57)	0,51	
				Acido Fólico	1,37	(0,99-1,89)	0,05	
				Folato Total ††		(0,74-1,59)	0,6	
				Placebo	1,08	(0,83-1,78)	0,25	
				Ácido Fólico	1,22			
				Folato plasmático*				
				<7,5ng/ml	0,61	(0,42-0,9)	0,01	
				>7,5 ng/ml	1,28	(0,82-1,99)	0,27	

#Ref= Referencia

Tend= Tendencia (Int)=Interacción

° 706 sujetos: 234 suplementados con ácido fólico, 236 sólo aspirina y 236 aspirina+folato

§ Investigar si asociación entre la suplementación con ácido fólico y riesgo de recurrencia de adenomas varía según nivel de folato basal, dietario y sérico

† Tercil superior/Tercil Inferior 353,1-1286,6/63,9-246,1 µg

†† Tercil superior/Tercil Inferior 552/1807,8/552-1807,8 µg

* Folato plasmático inicial

Tabla 2 Estudios Clínicos que evalúan la asociación entre diferentes polimorfismos, recurrencia de adenomas colorectales y suplementación con ácido fólico.

Ref.# País/Año	Nº Sujetos Suplementados /Placebo	Ácido Fólico Dosis Diaria (mg)	Duración	Polimorfismos Estudiados	RR	IC (95%)	P Int	Resultados
Hubner EEUU 2006(33)	279/267	0,5	3 años	MTHFR 677			0,3	<i>Solo observa una reducción no significativa del riesgo en sujetos suplementados heterocigotos para MTHFR 1298 AC/CC.</i>
				C>T	†	Referencia		
				CC	1	(0,46-1,1)		
				CT	0,71	(0,71-2,29)		
				TT	1,27	(0,56-1,21)		
				CT/TT	0,82			
				MTHFR 1298		Referencia		
				AA	1	(0,35-0,88)		
				AC	0,56	(0,64-1,56)		
				CC	1	(0,47-0,97)		
AC/CC	0,67							
Levine EEUU 2008(32)	516/505 §	1	I Etapa (3 años) y II Etapa (5 años)	MTHFR 677			0,75	<i>El genotipo de la MTHFR no modifica el riesgo de adenomas colorectales. En sujetos suplementados</i>
				C>T	§	(0,87-1,36)		
				CC	1,09	(0,85-1,33)		
				CT	1,06	(0,57-1,53)		
				TT	0,93			
				MTHFR 1298				
				AA	1,01	(0,81-1,26)		
				AC	1,11	(0,89-1,39)		
				CC	1,02	(0,62-1,68)		
				MTHFR 677/1298				
CC/AA	0,9	(0,6-1,35)						
CC/CC	1,04	(0,63-1,72)						
TT/CC	0,93	(0,56-1,53)						

Int=Interacción; † RR en sujetos suplementados con ácido fólico; § RR de sujetos suplementados con ácido fólico versus sujetos que recibieron Placebo

Manuscrito V

Castillo-Lancellotti C, Tur JA, Uauy R. Impact of folic acid fortification of flour on neural tube defects: a systematic review.

Public Health Nutr 2012;31:1-11.

Impact of folic acid flour fortification on neural tube defects: A systematic review

Cecilia Castillo-L¹, Josep A. Tur¹, Ricardo Uauy²

¹Research Group on Community Nutrition and Oxidative Stress, University of the Balearic Islands, 07122 Palma de Mallorca, Spain

²Public Health and Nutrition Unit, Laboratory of Molecular Epidemiology. Institute of Nutrition and Food Technology, University of Chile, Santiago, Chile.

Corresponding author (✉)

Cecilia Castillo L.

Fleming 6711 Las Condes Santiago, Chile.

Phone: 56-2-3421739 Fax 56-2-342 1739

e-mail: dracastillo@gmail.com

Running title: Folic acid fortification and neural tube defects

Keywords: folic acid, neural tube defects, spinal dysraphism, food fortification, systematic review.

Abstract

Objective: To review the impact of folic acid (FA) flour fortification (FF) on the prevalence of neural tube defects (NTDs).

Settings: Chile and Argentina, Brazil, Canada, Costa Rica, Iran, Jordan, South Africa, United States.

Design: Systematic review of the literature on Medline via Pubmed; Scopus; OvidSP and LILACS reporting the impact of FA flour fortification on the prevalence of NTDs in 2000-2011. Focus on Santiago of Chile's birth defects registry (1999-2009), and the monitoring of FA wheat FF. We analyzed the prevalence (NTD cases/10 000 births) pre and post-FF and the percentile distribution of FA content in flour (2005-2009). We explored the potential association between median FA in flour (mg/kg) and the prevalence of NTDs.

Results: Twenty-seven studies that met inclusion criteria were evaluated. Costa Rica showed a significant reduction in NTD (~ 60%). Prevalence in Chile decreased from 18.6 to 7.3/10 000 births from 1999-2007 and showed a slight increase to 8.5 in 2008-2009, possibly due to changes in fortification limits. When we related the prevalence of NTDs with levels of fortification, the lowest prevalence was observed at a FA level of 1.5 mg/kg.

Conclusions: FA flour fortification has had a major impact on NTDs in all countries where this has been reported. Chile showed a 55% reduction in NTDs prevalence between 1999- 2009. There is a need to constantly monitor the levels of FF to maximize benefits and prevent the potential risk of FA excess, moreover, to be vigilant for any new adverse effects associated with excess.

Introduction

The importance of nutrition in the aetiology of neural tube defects (NTDs) was suggested by Hibbard et al. who found that women deficient in folate had an increased number of abortions, placental abruptions and foetal malformations and intrauterine growth retardation ⁽¹⁾. The first report on folate deficiency and NTDs, published by Smithells et al. ^(2, 3), showed the protective effect of folic acid on the recurrence of NTDs. A randomised study by Czeizel et al. ⁽⁴⁾ showed a decrease in the *first* occurrence in women supplemented with twelve vitamins containing 0.8 mg of folic acid, but not in women supplemented with trace elements and a very low dose of vitamin C. A rigorous *double-blind randomised controlled trial* supported by the "UK Medical Research Council" showed that supplementing women who have a history of children with NTDs with 4 mg of folic acid daily decreases recurrence by 72% ⁽⁵⁾. Although some studies are retrospective, their results revealed an inverse relationship between NTDs and folic acid consumption of 100-400 µg/day ^(6,7). Based on this information, in 1992 the US Public Health Service recommended that all women planning to become pregnant consume 0.4 mg/day of folic acid starting one month prior to conception through the first trimester of pregnancy. Because supplementation not only reduced the occurrence of NTDs but also their recurrence, it was recommended that women who have already had an NTD-affected pregnancy consume 4 mg/day of folic acid throughout *the* pregnancy⁽⁸⁾. In 1998, the United States mandated that flour be fortified with folic acid to ensure an adequate supply of folate for women of childbearing age ⁽⁹⁾; currently, about sixty countries have similar mandates to ensure adequate access to folic acid ⁽¹⁰⁾.

Unlike studies that evaluate the effect of folic acid supplementation on the occurrence NTDs ⁽¹¹⁻¹³⁾, we conducted a systematic review of uncontrolled studies in different countries to assess the effectiveness of national folate fortification programs at preventing birth malformations, the NTD prevalence trends in Chile before and during fortification (1999-2009) and the potential relationship between Chilean NTDs and the folic acid content of wheat flour.

Materials and Methods

The systemic review included English and Spanish scientific journals between January 2000 and December 2011. The databases used included the following: Medline-Pubmed, Scopus, OvidSP, and Latin American and Caribbean Health Sciences Literature (LILACS). The descriptors used to search "Medical Subject Headings" (MESH) included the following: neural tube defects, spinal dysraphism, anencephaly, combined with folic acid and prevalence. From the 1185 articles identified, 106 potential studies were retrieved for detailed assessment after discarding duplicate articles, reviews and certain study designs. The articles were read and evaluated by one reviewer and checked by a second one using the inclusion and exclusion criteria (Table 1). Studies that reported exclusively non-NTD malformations were excluded, as well as studies that assessed changes in the NTD prevalence in response to folic acid in combination with other vitamins. Based on the application of these criteria, 27 studies of changes in the prevalence of NTDs, spina bifida and anencephaly in response to mandatory folic acid food fortification were included in this review.

Annual NTD prevalence in Chile was estimated from an Excel file database provided by the Epidemiology Department of the Chilean Ministry of Health. The database contained information from nine hospitals in Santiago, the capital of Chile, with established monitoring systems during the pre-fortification period (1999) and the fortification period (2000-2009). This prospective registry considered all newborns, including live births and stillbirths, with a recorded birth weight greater than 500 grams (g) and/or audited as foetal deaths, death under one year of age, hospital discharge birth registry books, newborn records, autopsies and/or other medical records. All NTDs, whether associated with other malformations, were listed and categorised based on the severity of the defects.

Information on the folic acid content of wheat flour in Chile was requested via e-mail from the General Director of the National Public Health Institute (NPHI) of Chile. The folic acid (mg/kg) content, determined by liquid chromatography, of the samples collected each trimester from the wheat flour mills registered with NPHI in 2005-2009 was shared electronically as an Excel spreadsheet⁽¹⁴⁾. Stata Statistical Software: Release

11 (College Station, TX: StataCorp LP 2009) was used to calculate the annual percentile distribution (P) of the folic acid content in the flour samples and the annual prevalence of NTD. Prevalence=($[\text{Total number of children with NTDs}/\text{total number of newborns}] * 10\,000$). We calculated the standard error of annual NTD prevalence based on the annual prevalence for each hospital included in the surveillance system. Descriptive analyses were used to describe the relationship between the annual NTDs prevalence and the median level of folic acid in wheat flour (mg/kg) considering the concurrent year.

Results

In response to fortification, there was a drop in the prevalence of neural tube defects in fifteen of the twenty-seven studies reported in this systematic review ^(15,16-29) (Table 2). The largest drops were observed in Costa Rica (58%)⁽²⁸⁾, Argentina (49.7%)⁽²⁵⁾ and Canada (49%)⁽²¹⁾. The smallest decrease was in the State of California in the United States (15.5%)⁽²³⁾. Twenty-one articles reported on the prevalence of spina bifida before and after flour fortification ^(15,16,19,21-23,25,26,28,30-41). The largest reductions reported were in Costa Rica (61%; Barboza et al.)⁽²⁸⁾, Canada (55%; De Wals et al.)⁽²¹⁾ and Chile (55%; Lopez-Carmelo et al.)⁽²⁵⁾. The latter study examined the number of NTD cases between the years 1998-2007. The smallest reduction in the prevalence of spina bifida was in the United States (3.4%, Boulet et al.)⁽⁴⁰⁾. This last study looked at two post-fortification periods (1999-2000 / 2003-2004) and assessed the effect of fortification stratified by ethnicity. The greatest decline in spina bifida in the US was in Hispanics, who also had the highest prevalence of spina bifida before fortification. The smallest decline was in blacks, who also had the lowest prevalence of spina bifida before fortification ⁽³⁶⁾.

With respect to anencephaly ^(15,16,19,21-23,25,26,29,30,32-37,39,40), the greatest reductions after fortification observed were in Costa Rica (68%)⁽²⁸⁾, the province of Ontario in Canada (58%)⁽¹⁶⁾, Argentina (57%)⁽²⁵⁾ and Chile (50%)⁽³⁵⁾. The smallest reduction was in South Africa (9.8%)⁽²²⁾ and in African-American subjects in the US (9.1%)⁽³⁶⁾. The presented data by Simmons et al. from Arkansas, US, showed no reduction in the prevalence of anencephaly after fortification ⁽¹⁹⁾.

The annual NTD prevalence provided by the Chilean surveillance system for nine Santiago hospitals during the pre (1999) and post-fortification (2000-2009) years is

shown in Figure 2. One year after fortification began (2001), there was a significant reduction in NTD prevalence (42%). The lowest prevalence was reached seven years after fortification began (7.03/10 000 newborns), a 60% reduction from the number of cases in 1999. Overall, the decrease in NTDs between 1999 and 2009 was 55%. There was a slight increase in NTDs (~20%) in 2008-2009 compared to 2007, the year with the lowest prevalence in the period analysed.

Table 3 shows the percentile distribution (P) of folic acid content of flour (mg/kg) between the years 2005-2009 in Chile. In 2005, the median folic acid content reached 1.9 mg/kg, close to the limit established by Chilean norms (2.2 mg/kg) ⁽⁴²⁾. It is important to mention that at least 10% of the flour samples analysed from 2005 to 2009 contained non-detectable amounts of folic acid. On the other hand, 20% of the flour samples contained a concentration in excess of that established by the norm. In 2008, there was a significant decrease in the folic acid levels in comparison to previous years (median = 1.1 mg/kg), increasing in 2009 (median = 1.6 mg/kg), when at least 5% of the samples had folic acid concentrations greater than 5.4 mg/kg.

The time course of the association between neural tube defect prevalence and median wheat flour folic acid content (mg/kg) in the concurrent year is shown in Figure 3. The highest prevalence of NTD during the period studied occurred when wheat flour folic acid content was at its lowest (median = 1.1 mg/kg) and the lowest prevalence occurred when median folic acid reached 1.5 mg/kg.

Discussion

NTDs are birth defects generated during the very early stages of embryonic development; they have a major impact on the health and quality of life of affected children and their families. Mandatory food fortification with folic acid has proven to be a cost-effective way to provide this critical nutrient during the periconceptual period and reduce the number of children affected by NTDs ^(22 43-45).

Different mechanisms have been suggested to explain how folic acid might prevent NTDs. Some authors have hypothesised that the presence of elevated folate receptor antibodies would limit folate transport to the early embryo, thus affecting its development ⁽⁴⁶⁾. Epigenetic mechanisms are likely involved in the aetiology. Given the role of folate in DNA methylation early during embryogenesis, lack of folate may affect

neural tube closure and cause defects. Changes in DNA methylation that lead to over-expression of genes involved in autoimmunity⁽⁴⁷⁾ have been linked to the development of NTDs. On the other hand, disruption of DNA methylation in animal models suggests that DNA methylation may also play a role in *neural tube closure*⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾.

Mandatory folic acid flour fortification significantly increases serum folate levels and red blood cell count in women of childbearing age, helping prevent neural tube defects^(50,51). The dose-dependent relationship between serum folate levels and the risk of having a child with an NTD has been described previously, with the highest risk occurring in women with significantly low folate levels in serum and red blood cell^(52,53).

According to this review, the largest reduction in NTDs after food fortification was observed in Costa Rica. This country not only fortifies wheat flour but also maize flour, cow's milk and rice⁽²⁸⁾. Other countries showed NTD reductions of about 50%^(16 20, 21 57) and similar reductions in spina bifida^(21 25 38) and anencephaly^(16 35 39). The results varied by country and depended on the integrity and quality of the country's surveillance system. For example, in some countries, the system is solely based on diagnostic information collected from birth certificates, which underestimates the number of stillbirths, foetal deaths and spontaneous and voluntary abortions⁽¹⁶⁾. Furthermore, the information collected prior to fortification may have been incomplete, thereby preventing accurate comparisons. Moreover, an adequate assessment of the impact of fortification on NTDs may be compromised by women who take folic acid vitamins, which further increase their folate levels⁽¹⁷⁾. The decrease in NTDs also varies by geographic region and social and demographic characteristics. Fortification has particularly benefited mothers with lower-incomes and older women with no social security coverage^(21 31). The greatest impact of fortification has been observed in regions or countries with a higher prevalence of NTDs prior to intervention^(20,39,54). Williams et al. looked at the prevalence of spina bifida and anencephaly in different ethnic groups in the U.S. They found the largest reductions in the Hispanic population and the smallest reduction in the African American population, which had a lower initial prevalence and, therefore, a lower potential reduction⁽³²⁾. These differences must be considered in addition to food consumption patterns, which differ in intake of folate-rich foods and vitamin supplements.

The existence of polymorphisms in the genes encoding enzymes in the folate biosynthetic pathway, such as MTHFR 677CT and 1298AC, especially homozygous MTHFR 677TT, may account for differences in NTD prevalence considering the reduced activity of the enzyme that converts 5-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, the main form of circulating folate ^(55,56). In populations with a higher prevalence of these polymorphisms, such as the Hispanic population, there is an increased number of congenital malformations compared to black or white populations. However, this increase in malformations does not occur in all groups with a high prevalence of these polymorphisms, suggesting that other genes or environmental factors may mediate this association. Other conditions, such as maternal diabetes and obesity, may also affect the presence of an NTD ^(57,58).

Some studies have shown that the decrease in the number spina bifida cases is greater than the decrease in anencephaly cases ^(15,21,30,32,36,37); however, other studies have shown a greater reduction in the latter ^(16,23,26,35,39,40). The observed divergence in relation to the decrease in NTDs is not well established. The smaller decrease in anencephaly cases is most likely the result of elective pregnancy termination being labelled as non-viable foetus, which may have also not been properly registered. Furthermore, there is no clear explanation for the higher number of female embryo anencephaly cases, which suggests that female embryos are more susceptible to environmental influences than male embryos. Alternatively, male embryos may be more susceptible to the lethal effects of toxin exposure, explaining the greater loss of male embryos with anencephaly in times of high prevalence ⁽³⁷⁾.

When assessing the impact of flour fortification on NTDs, it is important to acknowledge the secular trends of congenital malformations prior to the fortification of foods. However, this is not always possible because long-term data are needed and not always available.

Several countries in the Americas have implemented mandatory folic acid flour fortification, including Costa Rica, Guatemala, Honduras, Mexico, Nicaragua, Panama, Peru, Chile, Argentina, Canada and the United States; however, most of these countries do not have an adequate monitoring system for neural tube defects and other malformations, which may limit the validity of the final evaluation ⁽³⁹⁾.

Chile does not have a national surveillance system for neural tube defects; however, it does have a system that has monitored congenital malformations in public and private hospitals over the past 30 years, a system which belongs to the Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations (Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas, ECLAMC). This system only monitors approximately 7% of total births in Chile, including live birth and stillbirth infants weighing over 500 grams, which has permitted measurement of the secular trend as well as the impact of folic acid flour fortification in Chile ⁽⁵⁹⁾.

According to data provided by Lopez-Carmelo et al. of ECLAMC, Chile would not have had a downward trend in the number of NTD cases prior to the folic acid flour fortification. Therefore, the observed decrease in spina bifida and anencephaly cases in the first post-fortification period (2001-2002) can be exclusively explained by flour fortification ⁽³⁵⁾, which caused a significant increase in folate in women of childbearing age ⁽⁶⁰⁾. In 1999, another surveillance system for registering NTDs was established in nine public hospitals in Santiago, Chile's capital, accounting for 60% of city's births and 25% of the country's ⁽⁶⁰⁾. In Chile, termination of pregnancies and therapeutic abortions are not permitted and almost all deliveries occur in institutionalised settings. Therefore, the underestimation of NTDs is unlikely. The 55% reduction in NTDs between 1999 and 2009 demonstrates the positive impact of fortification in Chile. The present study's findings are based on the latest available data from the surveillance system of the nine hospitals mentioned previously. After 2009, the surveillance was interrupted (Figure 2), limiting future assessments.

The mandatory folic acid flour fortification in Chile that began in 2000 (2-2.4 mg/kg) aimed to *achieve* a folic acid intake of approximately 400 µg/day ⁽⁴²⁾. However, national monitoring of folic acid in flour started in 2005 when an analytical technique was implemented at the Institute of Public Health ⁽⁶¹⁾. The large dispersion observed in the levels of folic acid in flour samples (Table 2) forced the Ministry of Health in 2007 to request that milling companies adjust the amount of folic acid they add to wheat flour. This request resulted in a median decrease from 1.5 mg/kg to 1.1 mg/kg in 2008, and a decrease from 8.5 to 3.2 mg/kg for samples located at the 95th percentile. While, on the one hand, the existence of samples without folic acid reflects problems of quality control in the milling industry that could negatively impact the prevention of NTDs,

high levels of folic acid, which were detected in approximately 20% of the samples, could be a major risk factor in some populations. Although no data exist to ensure that the consumption of wheat flour-based food has remained stable among women of childbearing age, the described association between the yearly NTD prevalence and yearly median folic acid levels (median) suggests that a lower folic acid level can also be effective and that uncontrolled declines can negatively impact the results (Figure 3). It is important to keep in mind that since folic acid fortification started, there has been disagreement about what constitutes adequate levels of folic acid supplementation. To some extent these differences can be explained by the fact that the initial studies were designed to determine the role of folic acid in NTDs, not the lowest dose at which benefit was achieved ⁽⁶²⁾. Daly et al. predicted a decrease in NTD prevalence of 22, 41 and 47% with the consumption of 100, 200 and 400 µg/day of folic acid, respectively ⁽⁶³⁾, while Wald et al. predicted a decrease of 18, 35, and 53% with similar intakes ⁽⁶⁴⁾. In the studies that used multivitamins, the effect of folic acid could not be assessed independently, which is important given the recently described role of vitamin B12 in the prevention of these malformations ⁽⁶⁵⁾. Although the association between serum folate and NTDs at low levels is rather proportional than linear, the effects of high levels of folate intake have not been clearly established. Despite Wald et al.'s description of a linear (logarithmic) relationship among folic acid intake, serum folate and NTD reduction, with estimates that go beyond the main data, it is more common to observe a stabilisation that follows a saturation pattern, as observed in many metabolic processes, or a U-shaped curve with an increasing prevalence at the upper end ⁽⁶⁶⁾. From the serum folate values obtained in a variety of studies ^(63,67-69), some have estimated that adequate NTD prevention can be obtained with intakes close to 100 µg/day of folic acid, especially if the food is fortified and its consumption is constant and prolonged ^(63,66). This adaptation of the folic acid recommendation would maintain the benefits, while limiting the exposure of other population groups that do not necessarily benefit from folic acid food fortification ⁽⁷⁰⁻⁷²⁾, with the possibility of recommending higher doses in special cases such as women with a positive history of children with NTDs or polymorphisms associated with folate metabolism ⁽⁷³⁾. These adjustments should be kept in mind because some animal and clinical studies suggest that folate possesses dual modulatory effects on colorectal cancer development and progression, depending on the

timing and dose of folic acid intervention ^(70,74-76). Moreover, other studies have described positive associations between high serum folate and both anaemia and poor cognitive test performance in subjects deficient in vitamin B12^(71 77).

Conclusions

The studies included in this review show that folic acid flour fortification has significantly reduced the number of children with NTDs in all countries that have mandated it. In Chile, the mandatory fortification of wheat flour has led to a significant reduction in neural tube defects. One of the limitations for its supervision and evaluation has been the delayed implementation of a system for monitoring flour folic acid content and the lack of an adequate national surveillance system for congenital malformations. This situation shows the importance of establishing appropriate quality controls and a continuous monitoring system from the start, which in turn allows for early adjustments to fortification levels to better achieve the desired goal of NTD prevention while avoiding the potential consequences of excess.

References

1. Hibbard E D, Smithells R W (1965) Folic acid metabolism and human embryopathy. *Lancet***285**, 1254.
2. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ (1976) Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child***51**, 944-950.
3. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ *et al.* (1981) Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Arch Dis Child***56**, 911-918.
4. Czeizel AE, Dudas I (1992) Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med***327**, 1832-1835.
5. MRC Vitamin Study Research Group. (1991) Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet***8760**, 131-137.
6. Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA (1993) Periconceptional folic acid exposure and risk of occurring neural tube defects. *JAMA***269**, 1257-61.
7. Shaw GM, Schaffer D, Velie EM *et al.* (1995) Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology***6**, 219-226.
8. Public Health Service of the United States. (1992) Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of Spina bifida and other neural tube defects. *MMWR Morb Mortal Wkl Rep***41**, 1-7.
9. Food and Drug Administration (1996). Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. Final Rule. 21CFR Parts 136, 137, and 139. Fed. Regist, 61, 8781-8789.
10. Flour Fortification Initiative. Fortification Status January 2012. <http://www.sph.emory.edu/wheatflour//globalmap.php> (accessed January 2012).
11. Wolff T, Witkop CT, Miller T, *et al.* (2009). Folic acid supplementation for the prevention of neural tube defects: an update of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med***150**, 632-639
12. Lumley J, Watson L, Watson M *et al.* (2011) Withdrawn: Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, issue 4, CD001056.

13. Goh YI, Bollano E, Einarson TR *et al.* (2006) Prenatal multivitamin supplementation and rates of congenital anomalies: a meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can***8**,680-689.
14. Instituto de Salud Pública Chile. Programa de Fortificación de Harinas. <http://www.ispch.cl/programa-de-fortificacion-de-harinas> (accesed January 2011)
15. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ *et al.* (2001) Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA* **285**, 2981-2986.
16. Ray JG, Vermeulen MJ, Boss SC *et al.* (2002) Declining rate of folate insufficiency among adults following increased folic acid food fortification in Canada. *Can J Public Health***93**, 249-253
17. De Wals P, Rusen ID, Lee NS *et al.* (2003) Trend in prevalence of neural tube defects in Quebec. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol***67**, 919-923.
18. Chen LT, Rivera MA (2004) The Costa Rican experience: reduction of neural tube defects following food fortification programs. *Nutr Rev***62** Suppl.1, S40-S3.
19. Simmons CJ, Mosley BS, Fulton-Bond CA *et al.* (2004) Birth defects in Arkansas: is folic acid fortification making a difference? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol***70**, 559-564.
20. Hertrampf E, Cortés F Folic acid fortification of wheat flour: Chile (2004) *Nutr Rev* 2004; **62** Suppl.1, S44-48
21. De Wals P, Tairou F, Van Allen MI *et al.*(2007) Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *N Engl J Med***357**, 135-142.
22. Sayed AR, Bourne D, Pattinson R *et al.* (2008) Decline in the prevalence of neural tube defects following folic acid fortification and its cost-benefit in South Africa. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol***82**, 211-216.
23. Chen BH, Carmichael SL, Selvin S *et al.* (2008) NTD prevalences in central California before and after folic acid fortification. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol***82**, 547-552.
24. Pacheco SS, Braga C, Souza AI *et al.* (2009) Effects of folic acid fortification on the prevalence of neural tube defects. *Rev Saude Publica***43**, 565-71.

25. López-Camelo JS, Castilla EE, Orioli IM *et al.* (2010) Folic acid flour fortification: impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *Am J Med Genet A***152A**, 2444-2458.
26. Collins JS, Atkinson KK, Dean JH *et al.* (2011) Long term maintenance of neural tube defects prevention in a high prevalence state. *J Pediatr***159**, 143-149e2.
27. Amarin ZO, Obeidat AZ (2010) Effect of folic acid fortification on the incidence of neural tube defects. *Paediatr Perinat Epidemiol***24**, 349-351.
28. Barboza MP, Umaña LM (2011) Impacto de la fortificación de alimentos con ácido fólico en los defectos del tubo neural en Costa Rica. *Rev Panam Salud Publica***30**, 1-6
29. Abdollahi Z, Elmadfa I, Djazayeri A *et al.* (2011) Efficacy of flour fortification with folic acid in women of childbearing age in Iran. *Ann Nutr Metab***58**, 188-196
30. Mathews TJ, Honein MA, Erickson JD (2002) Spina bifida and anencephaly prevalence United States, 1991-2001. *MMWR Recomm Rep***51**, 9-11.
31. Meyer RE, Siega-Riz AM (2002) Sociodemographic patterns in spina bifida birth prevalence trends--North Carolina, 1995-1999. *MMWR Recomm Rep***51**, 12-5.
32. Williams LJ, Mai CT, Edmonds LD *et al.* (2002) Prevalence of spina bifida and anencephaly during the transition to mandatory folic acid fortification in the United States. *Teratology* **66**, 33-39.
33. Mersereau P, Kilker K, Fassett E *et al.* (2004) Spina bifida and anencephalia before and after folic acid mandate United States, 1995-1996 and 1999-2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep***53**, 362-365
34. Canfield MA, Collins JS, Botto LD *et al.* (2005) Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: findings from a multi-state population-based study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol***73**, 679-689.
35. López-Camelo JS, Orioli IM, da Graça Dutra M *et al.* (2005) Reduction of birth prevalence rates of neural tube defects after folic acid fortification in Chile. *Am J Med Genet A*. **135**, 120-5.
36. Williams LJ, Rasmussen SA, Flores A *et al.* (2005) Decline in the prevalence of spina bifida and anencephaly by race/ethnicity: 1995-2002. *Pediatrics***116**, 580-586.

37. Besser LM, Williams LJ, Cragan JD (2007) Interpreting changes in the epidemiology of anencephaly and spina bifida following folic acid fortification of the U.S. grain supply in the setting of long-term trends, Atlanta, Georgia, 1968-2003. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol***79**, 730-736.
38. De Wals P, Tairou F, Van Allen MI *et al.* (2008) Spina bifida before and after folic acid fortification in Canada. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol***82**, 622-626.
39. Calvo EB, Biglieri A. (2008) Impact of folic acid fortification on women's nutritional status and on the prevalence of neural tube defects. *Arch Argent Pediatr***106**, 492-498.
40. Boulet SL, Yang Q, Mai C *et al.* (2008) Trends in the postfortification prevalence of spina bifida and anencephaly in the United States. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol***82**, 527-532.
41. Orioli IM, Lima do Nascimento R, López-Camelo JS *et al.* (2011) Effects of folic acid fortification on spina bifida prevalence in Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol***91**, 831-835.
42. Ministry of Health (1999). *Technical Standard for the wheat flour fortification with vitamins and minerals*. Chile: MINSAL.
43. Kelly AE, Haddix AC, Scanlon RM *et al.* (1996) *Cost-effectiveness of strategies to prevent neural tube defects*. In *Cost-effectiveness in health and medicine*, pp. 312-349 [Gold MR, Siegel JE, Russell LB, Weinstein MC, editors]. New York: Oxford University Press.
44. Grosse SD, Waitzman NJ, Romano PS *et al.* (2005) Reevaluating the benefits of folic acid fortification in the United States: economic analysis, regulation, and public health. *Am J Public Health***95**, 1917-1922.
45. Llanos A, Hertrampf E, Cortes F *et al.* (2007) Cost-effectiveness of a folic acid fortification program in Chile. *Health Policy***83**(2-3) 295-303.
46. Cabrera RM, Shaw GM, Ballard JL *et al.* (2008) Autoantibodies to folate receptor during pregnancy and neural tube defect risk. *J Reprod Immunol***79**, 85-92.
47. Richardson BC. (2002) Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer. *J Nutr***132**, Suppl.8, S2401-S2405

48. Al-Gazalo LI, Padmanabhan R, Melnyk S. (2001) Abnormal folate metabolism and genetic polymorphism of the folate pathway in a child with Down syndrome and neural tube defect. *Am J Med Genet***103**, 128-132
49. Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M Neural tube defects and folate. (2006) *Nat Rev Neurosci* **7**, 724-731.
50. Ray JG, Vermeulen MJ, Boss SC *et al.* (2002) Increased red cell folate concentrations in women of reproductive age after Canadian folic acid food fortification. *Epidemiology***13**, 238-240.
51. Hertrampf E, Cortés F, Erickson JD *et al.* (2003) Consumption of folic acid-fortified bread improves folate status in women of reproductive age in Chile. *J Nutr***133**, 3166-3169.
52. Daly S, Mills JL, Molloy AM *et al.* (1997) Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. *Lancet***350**, 1666-1669.
53. Wald NJ, Law MR, Morris JK *et al.* (2001) Quantifying the effect of folic acid. *Lancet* **358**, 2069-2073.
54. Berry RJ, Li Z, Erickson JD *et al.* (1999) Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *N Engl J Med* **341**, 1485-1490.
55. Guinotte CL, Burns MG, Axume JA *et al.* (2003) Methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T variant modulates folate status response to controlled folate intakes in young women. *J Nutr***133**, 1272-1280.
56. Botto LD, Yang Q (2000) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol***151**, 862-877.
57. Cabrera RM, Hill DS, Etheredge AJ *et al.* (2004) Investigations into the etiology of neural tube defects. *Birth Defects Res C Embryo Today***72**, 330-344.
58. Waller DK, Shaw GM, Rasmussen SA *et al.* (2007) Prepregnancy obesity as a risk factor for structural birth defects. *Arch Pediatr Adolesc Med***161**, 745-750.
59. Nazer J, López-Carmelo J, Castilla E. (2001) Estudio de 30 años de vigilancia epidemiológica de defectos de tubo neural en Chile y en Latinoamérica. *Rev Med Chile***129**, 531-539.
60. Hertrampf E, Cortés F. (2004) Folic acid fortification of wheat flour: Chile. *Nutr Rev***62**, Suppl.1, S44-S48.

61. Castillo C, Tur JA, Uauy R. (2010) Flour fortification with folic acid in Chile. Unintended consequences. *Rev Med Chil***138**, 832-840.
62. Cuskelly G, McNulty H, Scott JM (1999) Fortification with low amounts of folic acid makes a significant difference in folate status in young women: implications for the prevention of neural tube defects. *Am J Clin Nutr***7**, 234–239.
63. Daly S, Mills JL, Molloy AM *et al.* (1997) Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. *Lancet***350**, 1666–1669.
64. Wald NJ, Law M, Hoffbrand AV. (2004) Folic acid fortification in the prevention of neural tube defects. *Am J Clin Nutr***80**, 1665-1666.
65. Thompson MD, Cole DE, Ray JG. (2009) Vitamin B-12 and neural tube defects: the Canadian experience. *Am J Clin Nutr***89**, Suppl., S697-S701.
66. Dary O. (2009) Nutritional interpretation of folic acid interventions. *Nutr Rev***67**, 235-244.
67. Hao L, Yang Q-H, Li Z *et al.* (2008) Folate status and homocysteine response to folic acid doses and withdrawal among young Chinese women in a large-scale randomized double-blind trial. *Am J Clin Nutr***88**, 448–457.
68. Quinlivan EP, Gregory JF 3rd. Reassessing folic acid consumption patterns in the United States (1999 2004): potential effect on neural tube defects and overexposure to folate. (2007) *Am J Clin Nutr***86**, 1773-1779.
69. Daly LE, Kirke PN, Molloy A *et al.* (1995) Folate levels and neural tube defects: implications for prevention. *JAMA***274**, 1698-1702.
70. Kim YI Folate and colorectal cancer: An evidence-base critical review (2007) *Mol Nutr Food Res***51**, 267-292.
71. Selhub J, Morris MS, Jaques PF *et al.* (2009) Folate-vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. *Am J Clin Nutr***89** Suppl. S702-S706.
72. Mason JB (2009) Folate, cancer risk, and the Greek god, Proteus: a tale of two chameleons. *Nutr Rev***67**, 206–212.
73. Moore LL, Bradlee ML, Singer MR *et al.* (2003) Folate intake and the risk of neural tube defects: an estimation of dose-response. *Epidemiology***14**, 200-2055.
74. Kim YI. (2008) Folic acid supplementation and cancer risk: point. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev***17**, 2220-2225.

75. Cole BF, Baron JA, Sandler RS *et al.* (2007) Polyp Prevention Study Group. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA***297**, 2351-2359.
76. Mason JB, Dickstein A, Jacques PF *et al.* (2007). A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16,1325-1329.
77. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH *et al.* (2010) Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors. *Am J Clin Nutr***91**, 1733-1744.

Table 1. Inclusion and Exclusion Criteria

Inclusion Criteria
Uncontrolled studies that describe NTDs, spina bifida and anencephaly prevalence in response to the mandatory acid folic food fortification.
Exclusion Criteria
Summaries, Case Reports, Editorials, Reviews
Case-control, Cohort and Randomized Clinical Trial Studies
Studies that describe response to folic acid in other congenital malformations
Association between NTDs and acid folic supplements
Associations between other nutrients and NTDs

Table 2. Description of the studies assessing the impact of flour fortification with folic acid in the prevalence of NTDs

Author Year * Reference	Country	Period	Spina Bifida †			Anencephaly †			NTD †			Source of data
			Pref.	Postf.	%	Pref.	Postf.	%	Pref.	Postf.	%	
Honein 2001 (15)	USA	1995-1996/ 1998/1999	2.62	2.02	22.0	1.16	1.03	11.2	3.78	3.1	18.0	Birth certificates from forty-five states and Washington, DC. (Connecticut, Maryland, New Mexico, New York and Oklahoma were excluded).
Mathew 2002 (30)	USA	1996/2001	2.63	2.0	24.0	1.19	0.94	21.0				Birth certificates from State Vital Statistics Office. (Maryland, New Mexico and New York were excluded).
Ray 2002 (16)	Canada Ontario	1994-1997/ 1998-2000	7.5	4.2	44.0	3.8	1.6	57.9	11.3	5.8	48.0	Antenatal diagnosis of NTD's on ultrasonography or fetal autopsy after therapeutic termination and all live births and stillborns affected (> 20 week's gestation).
Meyer 2002 (31)	USA North Carolina	1995-1996/ 1998-1999	6.46	4.7	27.0							Live births and the stillborns infants >20 week's gestation from Birth Defects Monitoring Program Collecting Information

Williams 2002 (32)	USA	1995-1996/ 1998-1999	6·68	4·04	39·5	4·18	3·36	19·6				Live births, fetal deaths and elective pregnancy terminations in twenty four states (nine states ascertained prenatally diagnosed of NTDs)
de Wals 2003 (17)	Canada Quebec	1996/2000							19·8	13·0	34·0	Live births and elective terminations of fetal malformations reported in the hospital administrative database (MedEcho)
Chen 2004 (18)	Costa Rica	1996-1998/ 1999-2000							9·7	6·3	35·0	Register of live births and stillborns weighting > 500 g from twenty four public hospitals
Mersereau 2004 (33)	USA	1995-1996/ 1999-2000	6·4	4·1	40·0	4·2	3·5	16·7				Live births, deaths stillbirths, fetal deaths and elective terminations from eight population-based birth defects surveillance systems
Simmons 2004 (19)	USA Arkansas	1993-1995/ 1999-2000	7·8	4·4	43·6	3·8	3·8	0	10·9	8·2	24·5	Prenatal and post natal diagnosis cases (≤ 2 years old) from the Arkansas Reproductive Health Monitoring System

										including live births, stillbirths, elective terminations and spontaneous abortions		
Hertrampf 2004 (20)	Chile	1999-2000/ 2001-2002							17.0	10.1	40.5	Birth defects surveillance system in nine hospitals of Santiago City including live births births and stillbirths > 500 g
Canfield 2005 (34)	USA	1995-1996/ 1999-2000	4.9	3.2	34.7	2.2	1.8	44.0				Population-based data from twenty-three States (eight ascertain birth defects among pregnancy terminations) and surveillance methods to identify prenatally diagnosed and electively termination cases.
López-C 2005 (35)	Chile	1990-2000/ 2001-2002	9.33	4.77	46.7	6.39	3.18	50.2				Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations in Chilean hospitals including live births and stillbirths weighing >500 g (approximately ≥ 22 gestational weeks)
Williams	USA	1995-1996/	H	H	H	H	H	H				Data from twenty-one

2005 (36)		1998-2002	6.49 W-NH	4.18 W-NH	35.6 W-NH	3.85 W-NH	2.84 W-NH	26.2 W-NH				birth defects surveillance systems (nine ascertained prenatally diagnosed NTD cases).
			5.13 B	3.37 B	34.3 B	2.79 B	1.98 B	29 B				
			3.57	2.9	18.8	1.98	1.8	9.1				
Besser 2007 (37)	USA Atlanta	1982-1993/ 1994-2003	4.7	3.5	25.5	2.9	2.5	13.8				Data from the Program Metropolitan Atlanta Congenital Defects including infants and fetuses of ~20 weeks gestation (hospital logs, disease indices, report of genetic tests and birth and foetal death certificates).
De Wals 2007 (21)	Canada	1995/2002	9.1	4.1	54.9	5.6	3.4	39.3	16.9	8.6	49.1	Study population . including live births, stillbirths and terminations of pregnancy among women residing in seven Canadian Provinces.
De Wals 2008 (38)	Canada		8.6	4.0	53.5							Study population . including live births, stillbirths and terminations of pregnancy among women residing in seven Canadian Provinces.
Sayed 2008	South Africa	2003-2004/ 2004-2005	9.3	5.4	41.9	4.1	3.7	9.8	14.1	9.8	30.5	Systems surveillance from twelve public

(22)													hospitals (four provinces) including live births and stillbirths.
Calvo 2008 (39)	Argentina	2000/2005	24·25	13·2	45·6	4·08	1·89	53·7					Hospital discharges of children (under one year old) from public hospitals.
Boulet ** 2008 (40)	USA	1999-2000/ 2003-2004	3·51	3·39	3·4	2·47	1·98	19·8					Birth certificates and prenatal data of live births and stillbirths from twenty-one birth defects surveillance systems
Chen 2008 (23)	EEUU California	1989-1996/ 1998-2003	5·49	4·55	17·1	3·47	2·66	23·3	8·52	7·2	15·5		Live births, foetal deaths (\geq twenty weeks gestation, foetuses spontaneously aborted (<20 weeks gestation) from eight California counties.
Pacheco 2009 (24)	Brazil Recife	2000-2004/ 2005-2006							7·2	5·1	29·2		National Information System on live births.
López-C 2010 (25)	Chile Argentina Brazil	1998-2001/ 2005/2007	10·2 12·7 14·5	4·6 6·6 14·2	54·9 48 2	6·3 8·6 11·2	3·7 3·7 6·9	41·3 57 38·3	19·8 24·5 31·4	10·1 12·3 24·3	48·9 49·7 22·6		Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations (17, 41 and 19 hospitals in Chile, Argentina and Brazil respectively)

Collins 2011 (26)	EEUU South Carolina	1996-1997/ 2008-2009	6·1	4·3	29·5	5·9	3·9	33·8	13·4	9·7	27·6	including live births and stillbirths > 500 g. Results of maternal ∞-fetoprotein laboratories, amniocentesis testing, pregnancy ultrasound scanning program, medical reports from delivery hospitals, birth and death certificates
Orioli 2011 (41)	Brazil	2004/2006	23·1	14·0	39·3							Live Births Information System.
Amarin 2010 (27)	Jordan North Area	2000-2001 2005-2006							18·5	9·5	48·6	Live births (Princess-Badea Teaching Hospital)
Barboza 2011 (28)	Costa Rica	1997/2009	7·3	2·9	61·0	3·7	1·2	68	12·0	5·1	58·0	Congenital Disease Registry Centre
Abdollahi 2011 (29)	Iran Golestan	2006-2008							31·6	21·9	31·0	Live births and stillbirths (≥ 20 weeks gestational age) and newborns weighing ≥500 g (Dezyani Hospital).

Pref., Pre-fortification Period; Postf., Post-fortification Period; %, Percentage reduction; H, Hispanics; W-NH, White no Hispanics; B, Black no Hispanics

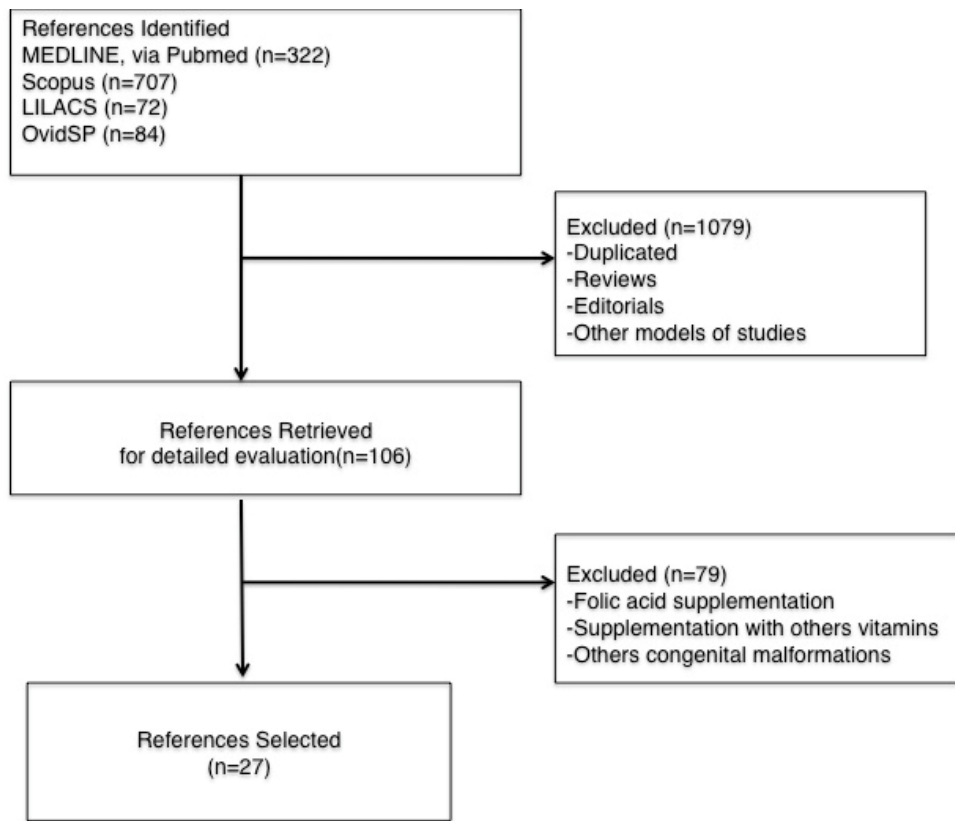


Figure 1. Article Selection Flowchart

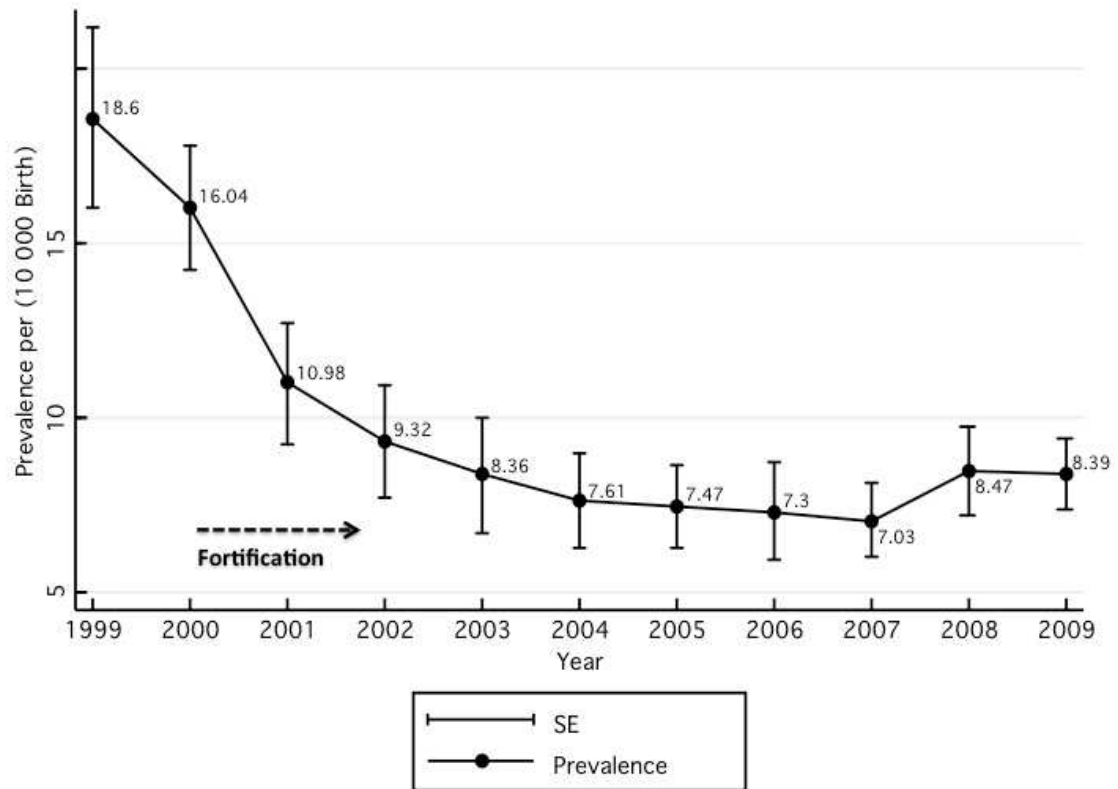


Figure 2. Prevalence of Neural Tube Defects in Chile 1999-2009 (S.E=Standard Error)

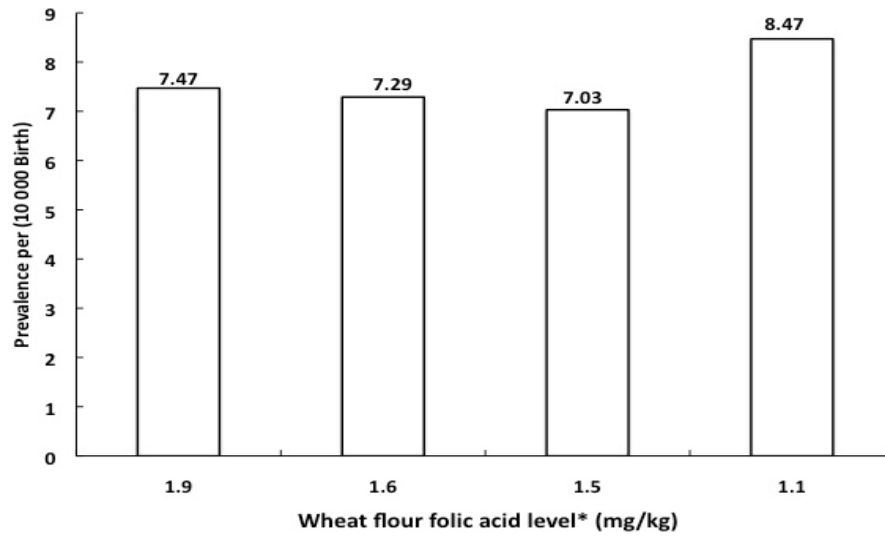


Figure 3. Folic Acid Content* in Wheat Flour (mg/kg) and Prevalence of Neural Tube Defects in Chile ** (* median; **concurrent year)

Table 3. Folic Acid Content in Wheat Flour (mg/kg) According to Percentiles (P).
Chile 2005 - 2009

Year	n	P10	P20	P30	P40	P50	P60	P70	P80	P90	P95	P97
2005	338	0	0.59	1.21	1.51	1.9	2.2	2.5	3	4.3	5.9	7.4
2006	391	0.2	0.65	1.01	1.36	1.61	1.99	2.4	3.06	5.03	9.8	15.9
2007	279	0.1	0.58	0.99	1.27	1.51	1.77	2.3	2.8	4.8	8.6	10.1
2008	243	0	0	0.3	0.68	1.1	1.5	1.8	2	2.6	3.2	3.74
2009	287	0	0.67	1.02	1.26	1.58	1.92	2.27	2.78	3.68	5.4	7.7

Manuscrito VI

Cecilia Castillo Lancellotti¹ . Josep A. Tur Marí¹ . Ricardo Uauy Dagach²

**Revisión Sistemática: folatos y vitamina B₁₂ sérica en adultos mayores chilenos y
estimación indirecta de ingesta de folatos**

(Remitido para su publicación)

Revisión Sistemática: folatos y vitamina B₁₂ sérica en adultos mayores chilenos y estimación indirecta de ingesta de folatos (Remitido para su publicación)

Cecilia Castillo Lancellotti¹ . Josep A. Tur Marí¹ . Ricardo Uauy Dagach²

¹Grup de Recerca en Nutrició Comunitària i Estrès Oxidatiu. Dpt. Biologia Fonamental i Ciències de la Salut. Universitat de les Illes Balears. Palma de Mallorca. España.

²Unidad de Salud Pública y Nutrición. Laboratorio de Epidemiología Molecular. Instituto Nutrición y Tecnología en Alimentos. Universidad de Chile. Santiago de Chile.

Correspondencia a: Dra. Cecilia Castillo L. Salvador 100 2º Piso Providencia. Santiago. Chile

Fono 56-2-23662000

Correo: dracastillo@gmail.com

Recuento de palabras: 2915

Resumen

En países con fortificación obligatoria de harina de trigo con ácido fólico (AF) se observa un aumento del nivel de folato sérico (FS) en toda la población. Se ha descrito que niveles elevados de FS podrían tener impactos negativos en la salud, especialmente en adultos mayores asociados a un bajo nivel sérico de vitamina B₁₂, que determinaría una mayor velocidad de deterioro cognitivo. El objetivo de este estudio fue desarrollar una revisión sistemática de estudios que describan nivel FS y vitamina B₁₂ en adultos mayores chilenos pre-fortificación (PF) y post-fortificación (PSF) con AF y estimar indirectamente la ingesta total folato basado en FS. Se revisaron las siguientes bases de datos: Medline, vía Pubmed, Scientific Libray On Line (SCIELO) y Latin American and Caribbean Health Sciences Literature (LILACS) considerando específicamente nivel sérico de folato y vitamina B₁₂ en adultos mayores. La estimación de la ingesta diaria de folato total se desarrolló a partir de la ecuación $[(EDF \mu\text{g}/\text{día} = \text{Folato sérico } \mu\text{g}/\text{L} - 0.132) / 0.0145]$. Se incluyeron cuatro estudios transversales que cumplieran criterios pre-establecidos. PSF de harina con ácido fólico se observa $\approx 50\%$ adultos mayores con niveles FS considerados suprafisiológicos ($\geq 20 \mu\text{g}/\text{L}$) probablemente determinados por una elevada ingesta de ácido fólico derivada de la fortificación. El nivel sérico de vitamina B₁₂ incrementó de 168 a 229 pmol/L en hombres y 240 a 332 pmol/L en mujeres. En adultos mayores chilenos el folato dietario y sérico y la vitamina B₁₂ han incrementado durante PSF alcanzando niveles suprafisiológicos en el caso del FS.

Palabras claves: ácido fólico, folato, vitamina B₁₂, fortificación, adultos mayores, cognición, revisión sistemática

Folate and vitamin B₁₂ in Chilean older adults

Summary. Evidence from countries with legally enforced folic acid (FA) fortification documents elevated serum folate (SF) concentrations in the entire population. Elevated FA is also associated at the population level with health risks specially associated with low vitamin B₁₂ thus potentially aggravating age related cognitive decline. We develop a systematic review studies providing information on SF and vitamin B₁₂ status before folate fortification (BFF) and after folate fortification (AFF) in Chilean older people; and estimate total folate intake indirectly based on SF concentrations. Medline via Pubmed and Latin American Scientific Library on Line (SCIELO) and Caribbean Health Sciences Literature (LILACS) were revised looking specifically at serum folate levels and vitamin B₁₂ in older adults and estimate total folate intake using equation $[(EDF \text{ mg/day} = \text{serum folate mg/L} - 0.132) / 0.0145]$. Four cross-sectional studies met pre-established criteria were included in the analysis. We observed that AFF \approx 50% of older adults had supraphysiological folate levels ($\geq 20 \mu\text{g/L}$) likely determined by the exposure to high folate. In parallel, mean serum vitamin B₁₂ increased from 168 to 229 pmol/L in men after fortification and in women from 240 to 332 pmol/L. Dietary folate, SF and vitamin B₁₂ increased AFF reaching supraphysiological levels in the case of folate.

Keywords: folic acid, folate, vitamin B₁₂, elderly, fortification, cognition, systematic review

Antecedentes

El ácido fólico, un folato sintético, se utiliza en la fortificación obligatoria de harina de trigo en numerosos países con el objetivo de disminuir la incidencia de los defectos congénitos del tubo neural (DTN) (1). Numerosos estudios han demostrado que esta intervención nutricional masiva es altamente costo efectiva en reducir este tipo de malformaciones congénitas (2-4). Sin embargo, su implementación ha determinado un aumento importante en los niveles de folato sérico no sólo de la mujer embarazada, el grupo objetivo de esta intervención nutricional, sino también, de toda la población intervenida (5-7).

Nuevas evidencias sugieren que la exposición de la población a altos niveles de ácido fólico podría tener un impacto negativo en la salud en algunos grupos de población (8). Entre otros efectos, se describe que niveles suprafisiológicos de folato sérico ($>20\mu\text{g/L}$) podrían favorecer una mayor velocidad en el deterioro cognitivo en adultos mayores, especialmente cuando estos altos niveles se asocian a un bajo nivel sérico de vitamina B₁₂ ($< 148 \text{ pg/ml}$)(9). Por otra parte, un bajo nivel de folato sérico se asociaría a una menor capacidad cognitiva como fallas en la memoria, disminución de la orientación, de la abstracción y de la capacidad para resolver problemas (10).

Chile estableció la fortificación obligatoria de harina de trigo con ácido fólico a partir de enero del año 2000, intervención que ha determinado una importante reducción de los DTN (11). Considerando el carácter universal de esta intervención se ha planteado como objetivo de esta revisión conocer el nivel de folato sérico en adultos mayores chilenos revisando estudios desarrollados durante el período pre y post-fortificación de harina de trigo, así como también, el nivel sérico de vitamina B₁₂ y estimar en forma indirecta la ingesta diaria de folato total (Equivalente Dietario de Folato. EDF $\mu\text{g/día}$) a partir del nivel de folato sérico ($\mu\text{g/L}$).

Material y Método

Se efectuó una búsqueda en revistas científicas en inglés y español entre enero de 1995 y marzo de 2012 provenientes de las siguientes bases de datos: Medline. vía Pubmed[®]; Scientific Library on Line (SCIELO) y Latin American and Caribbean Health Sciences Literature (LILACS) de los siguientes descriptores de ciencias de la salud “Medical

Subject Headings” (MESH): ácido fólico, vitamina B₁₂ combinado con adulto mayor, Chile y folato como texto. Para esta revisión se consideró como adulto mayor a sujetos ≥ 60 años considerando la entrega de algunos beneficios en Chile a este grupo de población (12). Se encontraron quince artículos de los cuales se seleccionaron para revisión tres potenciales estudios transversales que contenían información sobre nivel de folatos séricos y vitamina B₁₂ en adultos mayores, después de excluir artículos repetidos y con otros objetivos. Los artículos fueron leídos y evaluados por un revisor y verificados por un segundo revisor utilizando los criterios de inclusión (Tabla 1). También se agregó a esta revisión la información disponible sobre nivel de folato sérico y vitamina B₁₂ en adultos mayores proveniente de la Encuesta Nacional de Salud (ENS) desarrollada por el Ministerio de Salud de Chile durante los años 2009-2010 y publicada en su sitio Web (Figura 1) (13).

Los datos de nivel de folato sérico provenientes de los artículos seleccionados fueron convertidos a $\mu\text{g/L}$ cuando estos se expresaban en nmol/L ($\mu\text{g/L} = \text{nmol/L}/2.266$) (14). Para análisis y comparación entre los distintos estudios se consideró la mediana de folato sérico (percentil 50) y los percentiles (P) 25, 75 y 90. Cuando el valor de la mediana no estaba disponible se consideró el promedio y su desviación estándar. En ambos casos se consideró los niveles de folato sérico categorizados según sexo cuando éstos eran descritos en el estudio.

Para la estimación de la ingesta de folato total como Equivalente Dietario de Folatos (EDF) ($\mu\text{g/día}$) a partir de folato sérico se utilizó la fórmula de Quinlivan et al. (14,15) [$\text{EDF } \mu\text{g/día} = \text{Folato sérico } \mu\text{g/L} - 0.132$]/ 0.0145]. Se consideró deficiencia de folato sérico $<10 \mu\text{g/L}$ y exceso $>20 \mu\text{g/L}$ considerando los valores propuestos por Dary (13,16-18). Para definir déficit de vitamina B₁₂ se tomó como referencia un nivel sérico $<150 \text{ pmol/L}$ basado en las conclusiones del grupo de consulta técnica de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (19).

Resultados

Los valores de folato sérico en adultos mayores chilenos durante el período pre-fortificación y post-fortificación (a partir del año 2000) se muestran en la Tabla 2 (20-23). El primer estudio que recoge información durante el año 1998, antes de la

fortificación, muestra que la población estudiada presenta bajos niveles de folato sérico (3.08 y 3.97 $\mu\text{g/L}$ en hombres y mujeres respectivamente) (20). Un estudio desarrollado previo a la fortificación de alimentos, durante el último semestre del año 1999 (21) muestra un nivel sérico promedio de 7.6 $\mu\text{g/L}$ superior a lo descrito en el estudio anterior. Este mismo estudio se recoge información para los mismos individuos durante el segundo semestre del año 2000 (año en que se inicia la fortificación) mostrando un aumento del 100% en el nivel promedio de folato sérico (14.4 $\mu\text{g/L}$).

Otra investigación desarrollada cinco años después del inicio de la fortificación (22) describe una mediana de folato sérico de 15.6 y 16.6 $\mu\text{g/L}$ para hombres y mujeres respectivamente, destacando niveles definidos como suprafisiológicos en el P90 de ambos grupos de población (21.1 y 21.7 $\mu\text{g/L}$).

El último estudio que contiene información acerca del nivel de folato sérico en adultos mayores chilenos corresponde a la Encuesta Nacional de Salud (ENS) desarrollada por el Ministerio de Salud durante el año 2009-2010 (23). Esta encuesta muestra niveles de folato sérico superiores a lo descrito en los estudios desarrollados previamente, observándose valores sérico promedio de 19.7 $\mu\text{g/L}$ que alcanzan a 27 y 30.5 $\mu\text{g/L}$ en el P75 y 90 respectivamente.

El nivel sérico de vitamina B₁₂ descrito en los diferentes estudios se muestra en la Tabla 3. El estudio desarrollado durante el año 1998 (etapa pre-fortificación) muestra que los hombres presentaban un menor nivel sérico de vitamina B₁₂ que las mujeres (168 vs. 240 pmol/L) (19), describiéndose que 31 y 51% de los hombres y mujeres presentaban respectivamente déficit (<148 pmol/L) (20). En el estudio de Hirsch et al. (21) desarrollado durante el año 1999, también previo a la fortificación, se observa un nivel promedio de vitamina B₁₂ sérica de 246.8 pmol/L, observándose déficit (definido como un nivel <160pmol/L), en el 27.6% de los casos. Sánchez et al. (22) encuentra cinco años después niveles más elevados de vitaminas B₁₂ tanto en hombres(289pmol/L) y mujeres (375pmol/L) y describiendo que 12% de los sujetos presentaba déficit (<148pml/L). En la Encuesta Nacional de Salud (23) el promedio sérico de vitamina B₁₂ observado es de 324pmol/L, describiéndose déficit en 8.5% de la población. Al igual que en estudios anteriores se observa que las mujeres presentan un mayor nivel sérico de esta vitamina.

En la Tabla 4 se presenta la estimación indirecta de la ingesta total de folato como EDF/ $\mu\text{g}/\text{día}$ utilizando la ecuación lineal definida por Quinlivan et al. (15). Se observa que la ingesta promedio estimada de folato total en el estudio desarrollado durante el año 1988 (pre-fortificación) se encontraba bajo el Requerimiento Promedio Estimado (RPE) para folato ($320 \text{ EDF}\mu\text{g}/\text{día}$), siendo mayor el déficit en hombres que en mujeres (207 vs. $259.9 \text{ EDF } \mu\text{g}/\text{día}$). La estimación de ingesta de folato considerando el nivel de folato sérico recolectado durante el semestre anterior al inicio de la fortificación permite estimar que la ingesta diaria alcanzaba a $483.9 \text{ EDF } \mu\text{g}/\text{día}$, valor cercano a la Ingesta Diaria Recomendada (IDR) para folato ($400 \mu\text{g}/\text{día}$), siendo mayor en mujeres que en hombres (520.6 vs. $440 \text{ EDF } \mu\text{g}/\text{día}$). En este mismo estudio que evalúa folato sérico un año después se observa que la ingesta promedio estimada de EDF se duplicaba ($991\mu\text{g}/\text{día}$). Los valores de ingesta de EDF considerando los niveles de folato sérico presentes en la Encuesta Nacional de Salud del año 2009-2010 alcanzarían en promedio valores superiores a $1350\mu\text{g}/\text{EDF}/\text{día}$. Estos corresponderían a una ingesta elevada de folatos con valores cercanos a $2094\mu\text{g}/\text{EDF}/\text{día}$ en el percentil 90 de la distribución.

La Figura 2 describe en forma gráfica la modificación en la ingesta de folato estimada en los adultos mayores chilenos después de la fortificación, destacando el desplazamiento de la curva hacia la derecha, con altos niveles de ingesta nueve años después del inicio de la fortificación obligatoria con ácido fólico.

Discusión

Algunos de los países que han fortificado harina de trigo con ácido fólico en forma universal como Estados Unidos y Canadá, cuentan con un sistema de monitoreo de indicadores bioquímicos que han permitido observar no solo la tendencia, sino que evaluar el incremento del nivel de folato sérico en diferentes grupos de población (16, 24,25). A diferencia de estos países, Chile inicia la fortificación obligatoria de harina de trigo con ácido fólico ($2\text{-}2.4 \text{ mg}/\text{kg}$.) en enero del año 2000 (26), sin embargo, no desarrolla en forma paralela un sistema de monitoreo de folato sérico en ningún grupo poblacional. Esto representa una limitación para la evaluación de la fortificación, no sólo en el grupo población definido como objetivo, las embarazadas, sino en toda la población expuesta a esta intervención nutricional. Teniendo presente estas

limitaciones, se ha planteado como objetivo de esta revisión conocer el resultado de la fortificación en el nivel sérico de folato en los adultos mayores chilenos y estimar en forma indirecta el consumo de folato dietario total analizando los resultados de estudios desarrollados en Chile durante la etapa pre y post-fortificación de harina de trigo. Considerando la importante interrelación metabólica sérica entre el folato y la vitamina B₁₂ (22) , se ha considerado pertinente evaluar la tendencia en el nivel sérico de esta vitamina.

Los estudios seleccionados en esta revisión corresponden a todas las investigaciones desarrolladas en Chile donde se determinó nivel sérico de estas vitaminas en adultos mayores. Debe destacarse como limitación de este estudio, la escasa información disponible en Chile en relación folato y vitamina B₁₂ y que la información recolectada de estos estudios corresponden a muestra de grupos específicos de población, a excepción de la Encuesta Nacional de Salud que corresponde a una muestra representativa a nivel nacional (23).

El primer artículo desarrollado durante el año 1988 muestra el nivel de folato sérico en adultos mayores de bajo nivel socioeconómico. Este estudio corresponde a una muestra pequeña, 274 adultos mayores provenientes de Santiago, la capital de Chile con un nivel sérico promedio de folato bajo (7.5 µg/L). Se describe además, que 50% de los hombres y 30% de las mujeres presentaban déficit de folato sérico (19). De este modo, la fortificación obligatoria de harina de trigo con ácido fólico habría representado un beneficio para el estado nutricional de este grupo poblacional.

El efecto temprano de la fortificación puede observarse en el estudio de Hirsch et al. (21), que muestra un incremento del 50% en el nivel de folato sérico en la población estudiada seis meses después de iniciada la fortificación. A diferencia del estudio de Olivares et al. (20) en el año 1998 que muestra un importante déficit de folato, en el estudio de Hirsch et al. (21), seis meses antes de la fortificación (año 1999), se observan niveles adecuados de folato sérico. Esta diferencia podría ser explicada porque, en algunos molinos, la fortificación se inició antes de la fecha establecida por el Ministerio de Salud o bien por el acceso de estos ancianos a un alimento fortificado gratuito que entrega el Ministerio de Salud en algunos Centros de Atención Primaria (12). El estudio de Sánchez et al. (22) que recoge información entre los años 2005 y

2008 muestra un importante aumento en el nivel de folato sérico en relación a los niveles observados en etapa de pre-fortificación(20), observándose niveles considerados suprafisiológicos ($>20\mu\text{g/L}$) en el P75 de la distribución. El último estudio considerado en esta revisión corresponde una submuestra representativa a nivel nacional de los adultos chilenos mayores de 65 años provenientes de la Encuesta Nacional de Salud desarrollada entre los años 2009 y 2010 (23). En ella se describen niveles de folato sérico promedio superiores a los descritos por Sánchez et al. (22) y niveles definidos como suprafisiológicos ($19.7\mu\text{g/L}$) evidenciando el impacto de la fortificación de harina en la ingesta de folato.

Numerosas publicaciones han descrito un efecto beneficioso en la función cognitiva de los adultos mayores con déficit de folato cuando son suplementados con ácido fólico (27) o cuando éstos presentan un nivel elevado de folato sérico asociado a valores normales de vitamina B₁₂. Los estudios revisados muestran que la deficiencia de vitamina B₁₂ medida como nivel sérico en adultos mayores chilenos ha disminuido en la etapa post-fortificación de harina de trigo, aún cuando no existe un programa de fortificación obligatoria de alimentos específico para ella. Sin embargo, la entrega gratuita de alimentos suplementados (leche sin lactosa y crema de verduras instantánea) a adultos mayores de menor nivel socioeconómico, así como, un mayor acceso a alimentos de mayor calidad nutricional, entre ellos, alimentos fortificados con vitamina B₁₂ podrían representar una contribución en la mejoría de estos niveles (12).

Por otra parte, algunos estudios señalan que cuando los adultos mayores presentan altos niveles de folato sérico asociados a un bajo nivel de vitamina B₁₂ podrían presentar una mayor velocidad de deterioro de la función cognitiva cuando esta es medida aplicando diferentes pruebas de evaluación cognitiva (28,29). Esta hipótesis se basa en que el exceso de ácido fólico, así como sus metabolitos, actuarían como aceptores de electrones durante su metabolismo (oxidantes). Esto causaría una oxidación irreversible de la vitamina B₁₂, aumentando de esta manera su déficit en una forma semejante a lo observado en la exposición a ácido nítrico (30). Esta oxidación irreversible de la vitamina B₁₂, que actúa en forma asociada con la enzima metionina-sintetasa, disminuiría su disponibilidad o exacerbaría el déficit, considerando además, que ésta actúa como cofactor para la reacción mitocondrial en el cual la metilmalonil-CoenzimaA-mutasa cataliza el reordenamiento de la metil-CoenzimaA a succinil-

CoenzimaA determinando una acumulación del ácido metil-malónico. También podría producirse una acumulación de la homocisteína por disminución de la conversión del 5-metil-tetrahidrofolato en tetra-hidrofolato, la forma necesaria para la síntesis de poliglutamatos en el interior de la célula, así como, la imposibilidad de revertir el 5 metil-tetrahidrofolato a 5-10 metilen tetrahidrofolato, denominada también teoría del atrapamiento de metilos, proceso que podría ser determinante en las alteraciones neurológicas (31).

Sánchez et al.(22) describe en su artículo que alrededor del 15.9% de los individuos que presentan niveles suprafisiológicos de folato sérico tienen un bajo nivel de vitamina B₁₂. Esta relación podría constituir un mayor riesgo en el deterioro de la función cognitiva de los adultos mayores chilenos que necesita ser estudiada. Un punto importante a considerar en el diagnóstico de déficit de esta vitamina son los indicadores bioquímicos utilizados para su determinación. La incorporación de otros marcadores de deficiencia más sensibles que el nivel sérico como son la determinación de ácido metil-malónico (AMM) y la holotranscobalamina, permitirían un mejor diagnóstico del déficit de esta vitamina, así como también, la pesquisa precoz de un déficit marginal (32).

Chile no cuenta con encuestas alimentarias que permitan determinar la ingesta de folato total. La ecuación propuesta por Quinlivan & Gregory (14.15), si bien corresponde a una forma indirecta para establecer consumo de folatos a partir de folato sérico, resulta ser una herramienta útil para estimar la ingesta de EDF diarios y los riesgos por déficit y/o exceso. Esta ecuación corresponde a una regresión lineal elaborada a partir de estudios que reportaban consumo de folato y niveles séricos. validados con encuestas de consumo que muestran una alta correlación y que ha sido utilizada en otros estudios para estimar ingesta de folato (33). Considerando que el pan es uno de los alimentos básicos y de consumo diario en la dieta de los chilenos, el incremento de la ingesta de folato estimada a partir de esta fórmula (Tabla 4) provendría en gran medida de productos elaborados en base a harina de trigo, especialmente si se tiene presente los altos niveles encontrados en el sistema de monitoreo de ácido fólico en harina de trigo que desarrolla el Ministerio de Salud de Chile (34). Los datos de ingesta que se han estimado utilizando los niveles de folato sérico de la ENS sugiere que alrededor de 25% de los adultos mayores estudiados podría sobrepasar el Nivel Máximo Tolerable diario para ácido fólico (1000µg/día) (18) que podrían determinar una aumento en la

probabilidad de riesgos en salud (8). Se debe tener presente que esta ecuación puede ser imprecisa en la estimación de folato dietario en los niveles más elevados de folato sérico debido al uso de diferentes fuentes de información en su construcción y a la imprecisión de algunos datos utilizados en esta regresión que determinan una línea recta, cuando se esperaría, al igual que en otros procesos biológicos, que el exceso de ingesta pudiera semejar más bien una curva de saturación que de incremento indefinido (14).

En conclusión, esta revisión muestra que los niveles de folato sérico en adultos mayores chilenos han incrementado durante la etapa de post-fortificación, alcanzado en el caso del folato, niveles suprafisiológicos en un porcentaje importante de los adultos mayores. Se observa además, un incremento en los niveles séricos de vitamina B₁₂ asociado probablemente a una mejoría en la calidad de la dieta. Estos hallazgos sugieren la necesidad de estudiar los efectos en salud en adultos mayores, así como, establecer un sistema de monitoreo que permita revisar y adecuar el nivel de fortificación de la harina de trigo con ácido fólico en Chile, manteniendo los beneficios asociados a la reducción de los defectos de tubo neural en los recién nacidos, pero que limite los riesgos en salud en otras poblaciones.

Referencias

1. Flour Fortification Initiative. Fortification Status January 2012 Disponible en <http://www.sph.emory.edu/wheatflour//globalmap.php> [Consultado el 7 Agosto 2012].
2. Llanos A. Hertrampf E. Cortes F. Pardo A. Grosse SD. Uauy R. Cost-effectiveness of a folic acid fortification program in Chile. *Health Policy* 2007; 83: 295-303.
3. Bentley TG. Weinstein MC. Willett WC. Kuntz KM. A cost-effectiveness analysis of folic acid fortification policy in the United States. *Public Health Nutr.* 2009; 12: 455-67.
4. Sayed AR. Bourne D. Pattinson R. Nixon J. Henderson B. Decline in the prevalence of neural tube defects following folic acid fortification and its cost-benefit in South Africa. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008; 82: 211-6
5. Pfeiffer CM. Hughes JP. Lacher DA. Bailey RL. Berry RJ. Zhang M et al. Estimation of trends in serum and RBC folate in the U.S. population from pre- to postfortification using assay-adjusted data from the NHANES 1988-2010. *J Nutr.* 2012; 142: 886-93.
6. Shuaibi AM. House JD. Sevenhuysen GP. Folate status of young Canadian women after folic acid fortification of grain products. *J Am Diet Assoc.* 2008; 108: 2090-4.
7. Chen LT. Rivera MA. The Costa Rican experience: reduction of neural tube defects following food fortification programs. *Nutr Rev.* 2004; 62: S40-3.
8. Lucock M. Yates Z. Folic acid fortification: a double-edged sword. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2009; 12: 555-64.
9. Selhub J. Morris MS. Jacques PF. Rosenberg IH. Folate-vitamin B₁₂ interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B₁₂ deficiency. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 702S-6S
10. Ramos MI. Allen LH. Mungas DM. Jagust WJ. Haan MN. Green R. et al. Low folate status is associated with impaired cognitive function and dementia in the Sacramento Area Latino Study on Aging. *Am J Clin Nutr* 2005; 82 : 1346-52.
11. Hertrampf E. Cortés F. National food-fortification program with folic acid in Chile. *Food Nutr Bull* 2008; 29 (2 Suppl): S231-7.
12. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Programa de Alimentación

- Complementaria del Adulto Mayor. Disponible en: http://www.minsal.gob.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_alimentos/prot_p_an.html [Consultado el 5 de agosto de 2012].
13. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud. Disponible en <http://www.encuestasalud.cl/ens/resultados/> [Consultado el 2 septiembre de 2012].
 14. Dary O. Nutritional interpretation of folic acid interventions. *Nutr Rev* 2009; 67: 235-44.
 15. Quinlivan EP. Gregory JF 3rd. Reassessing folic acid consumption patterns in the United States (1999-2004): potential effect on neural tube defects and overexposure to folate. *Am J Clin Nutr*. 2007; 86: 1773-9.
 16. Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B12 status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Food Nutr Bull* 2008; 29: S52-63
 17. Pfeiffer CM. Caudill SP. Gunter EW. Osterloh J. Sampson EJ. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 442-50.
 18. Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. Dietary reference intakes: thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline. A Report of the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins and Choline and Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients. Washington, DC: National Academy Press. 1998.
 19. de Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B₁₂ deficiencies. *Food Nutr Bull*. 2008; 29 : S238-44.
 20. Olivares M. Hertrampf E. Capurro MT. Wegner D. Prevalence of anemia in elderly subjects living at home: role of micronutrient deficiency and inflammation. *Eur J Clin Nutr*. 2000; 54: 834-9.
 21. Hirsch S. de la Maza P. Barrera G. Gattás V. Petermann M. Bunout D. The Chilean flour folic acid fortification program reduces serum homocysteine levels and masks vitamin B₁₂ deficiency in elderly people. *J Nutr*. 2002; 132: 289-91.

22. Sánchez H. Albala C. Hertrampf E. Verdugo R. Lavados M. Castillo JL et al. Prevalence of vitamin B₁₂ deficiency in older adults. *Rev Med Chil.* 2010; 138: 44-52.
23. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud Chile. Encuesta Nacional de Salud 2009-2010. Disponible en <http://www.encuestasalud.cl/> [Consultado el 5 de mayo de 2012].
24. Shuaibi AM. House JD. Sevenhuysen GP. Folate status of young Canadian women after folic acid fortification of grain products. *J Am Diet Assoc.* 2008; 108: 2090-4.
25. Ray JG. Efficacy of Canadian folic acid food fortification. *Food Nutr Bull.* 2008; 29: S 225-30.
26. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Reglamento Sanitario de Alimentos Disponible en http://www.minsal.gob.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_alimentos/prot_a_lim_y_nutr.html [Consultado el 5 de agosto de 2012]
27. Malouf R. Grimley Evans J. Folic acid with or without vitamin B₁₂ for the prevention and treatment of healthy elderly and demented people. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; (4): CD 004514.
28. Morris MS. Jacques PF. Rosenberg IH. Selhub J. Folate and vitamin B₁₂ status in of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 193-200.
29. Morris MS. Jacques PF. Rosenberg IH. Selhub J. Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 1733-44.
30. Drummond JT. Matthews RG. Nitrous oxide degradation by cobalamin-dependent methionine synthase: characterization of the reactants and products in the inactivation reaction. *Biochemistry.* 1994; 33: 3732-41.
31. Selhub J. Savaria MS. Jaques PF. In vitamin B₁₂ deficiency, higher serum folate is associated with increased total homocysteine and methylmalonic acid concentrations. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104: 1995-2000
32. Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B₁₂ status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94: 666S-72S.
33. Dary O. Establishing safe and potentially efficacious fortification contents for folic acid and vitamin B₁₂. *Food Nutr Bull* 2008; 29: S214-24.

34. Castillo C. Tur JA. Uauy R. Flour fortification with folic acid in Chile. Unintended consequences. Rev Med Chil. 2010; 138: 832-40.

Tabla 1. Criterios de Inclusión y Exclusión

Criterios de Inclusión
Adultos chilenos ≥ 60 años
Descripción de nivel sérico de folato
Descripción de nivel sérico de Vitamina B ₁₂
Criterios de exclusión
Otros grupos poblacionales
Descripción exclusiva de otros indicadores bioquímicos
Ingesta dietaria de folatos

Figura 1. Flujograma de selección de artículos

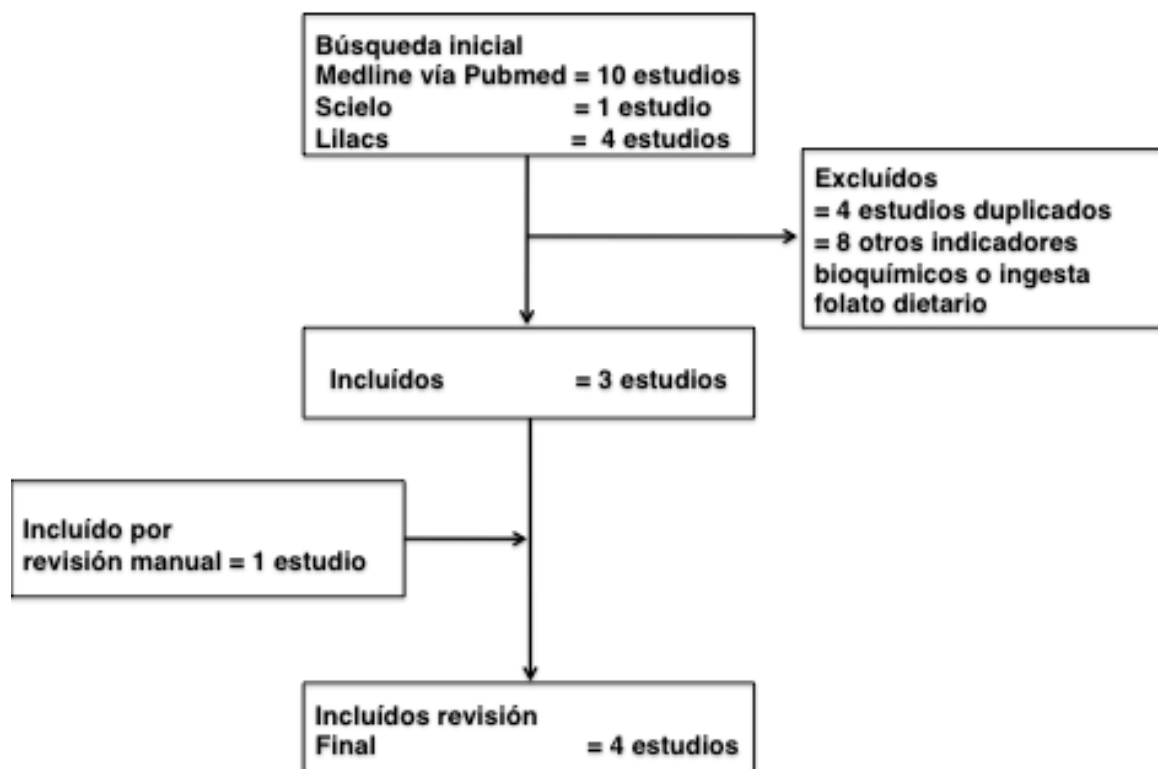


Tabla 2. Nivel de folato sérico (ug/L) en adultos mayores chilenos en estudios seleccionados

Fuente* (Referencia)	Año [†]	N	Edad (años)	Folato sérico (ug/L)				
				P25	P50/Promedio	P 75	P 90	
Olivares (20)	1998		≥60					
		Hombres		93	3.08(1.76-5.7)			
Mujeres		181			3.9 7(2.2-7.5)			
Hirsch (21) †	1999		≥ 70		**			
		Total		108	7.15 ± 2.7			
		Hombres		43	6.57 ± 2.55			
Mujeres	65	7.68 ± 2.68						
Hirsch (21) ‡‡	2000	108	≥ 70		**			
					14.43±3.13			
Sánchez (22)	2005-2008		65-87					
		Hombres		329	12.4	15.58	18.3	21.1
Mujeres	699	13.7	16.59	19.1	21.7			
MINSAL ENS (23)	2009-2010		≥65					
		Total		847	14.6	19.7	27	
		Hombres		321	14.6	19.8	24	
Mujeres	526	14.6	19.5	29				

* Primer autor ; † Año de recolección de la muestra; || Promedio Geométrico y DS ±1; ** Promedio ± Desviación Estándar; † Prefortificación; ‡‡ Postfortificación

Tabla 3. Nivel de vitamina B₁₂(pmol/L) en adultos mayores chilenos en estudios seleccionados

Fuente* (Referencia)	Año ¹	N	Edad	Nivel sérico de vitamina B ₁₂ (pmol/L)				Porcentaje de déficit (%)	
				P25	P50/Promedio	P75	P90		
Olivares (20)	1998	Hombres 93	≥60	167.5	168(89-320)	447.4	694.7	51.1%	
		Mujeres 181			240(11-518)			887.8	30.9%
Hirsch (21) †	1999	Total 149	≥ 70	180	**	447.4	694.7	27.6%	
		Hombres 43			246.8±231.2			887.8	
		Mujeres 65			237.2±244.5			610.1	
Hirsch (21) ††	2000	Total 149	≥ 70	180	**	447.4	694.7		
		Hombres 43			246.8±231.2			887.8	
		Mujeres 65			237.2±244.5			610.1	
Sánchez (22)	2005-2008	Hombres 329	65-87	167.5	289.1	447.4	694.7	18.2%	
		Mujeres 699		244	375.4	610.1	887.8	9%	
								Total 12%	
								‡‡‡ 15.9%	
MINSAL ENS (23)	2009-2010	Total 847	≥65	180	229.5	318.7	351.9	8.5%	
		Hombres 321		185.2	244.5	332	427.2	6.5%	
		Mujeres 526		181.5	239	318.7	392.5	10.1%	

*

Primer autor; † Año de recolección de la muestra; †† Promedio Geométrico y DS ± 1 ; ** Promedio \pm Desviación Estándar; ††† Prefortificación; †††† Postfortificación; ††††† Déficit <148 pmol/L; †††††† Déficit <165 pmol/L ††††††† El 15.9% de los sujetos con niveles suprafisiológicos de folato sérico(>20ug/L) presentaban déficit de vitamina B12 <148 pmol/L

Tabla 4. Estimación de ingesta de folato total(EDF $\mu\text{g}/\text{día}$) en adultos mayores según fórmula Quinlivan

Fuente (Referencia) *	Año †	N	Edad (años)	EDF ($\mu\text{g}/\text{día}$)			
				P25	P50/Promedio	P 75	P 90
Olivares(20)	1998	Hombres 93	≥ 60		 207.4		
		Mujeres 181			259.9		
Hirsch (21) †	1999	Total 149	≥ 70		** 483.9		
		Hombres 43			440.0		
		Mujeres 65			520.6		
					**		
Hirsch (21) ††	2000	Total	≥ 70		991.2		
Sánchez(22)	2005-2008	Hombre 329	65-87	851.2	1070.3	1259.0	1447.7
		Mujeres 699		939.5	1140.3	1313.8	1493.4
MINSAL ENS(23)	2009-2010	Total 847	≥ 65	1002.8	1354.6	1858.1	2094.3
		Hombres 321		1002.9	1361.5	1651.2	2397.8
		Mujeres 526		1002.9	1340.8	1996.0	2308.1

* Primer autor; † Año de recolección de la muestra ; || Valores derivados del Promedio Geométrico y DS ± 1 ; ** Promedio \pm Desviación Estándar
 † Prefortificación; †† Postfortificación

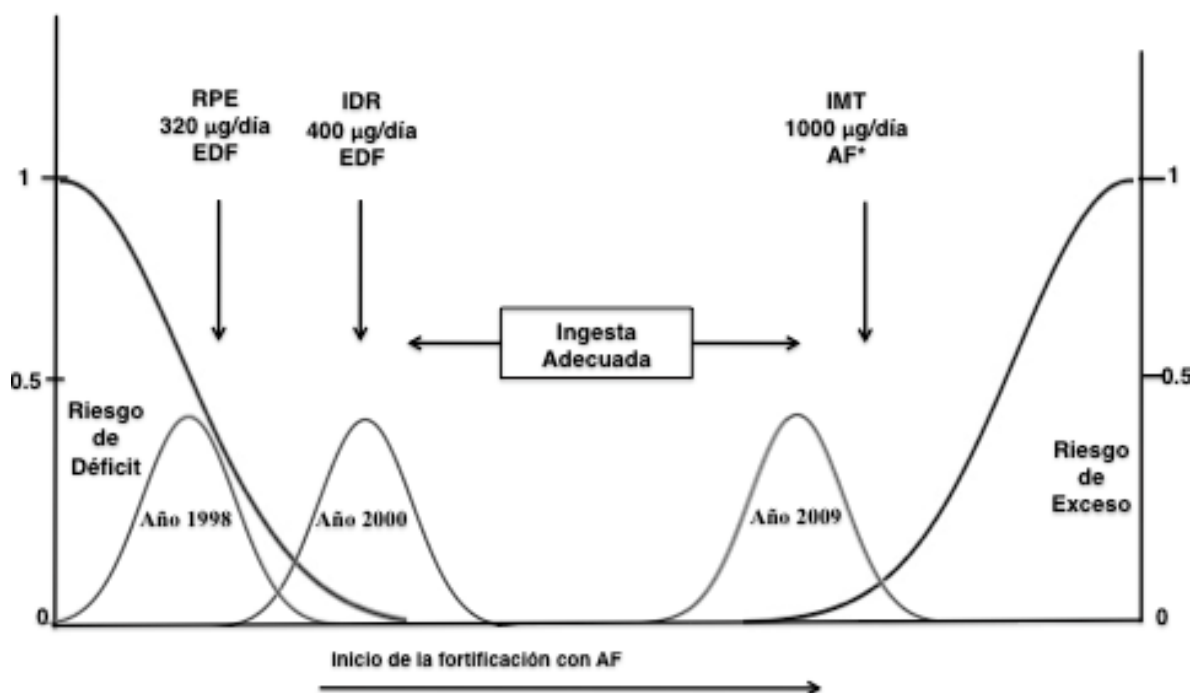


Figura 2. Efecto de la fortificación de harina de trigo en la ingesta total de folatos (EDF) en adultos mayores chilenos.

Manuscrito VII

**Castillo Lancellotti C, Margozzini P., Valdivia G, Padilla O, Uauy R,
Rozowski J, Tur JA.**

**Nivel sérico de Folato y Vitamina B₁₂ en adultos mayores chilenos.
Resultados de la Encuesta Nacional de Salud ENS 2009-2010.**

Rev Med Chil 2013;141(9):1107-1116.

Nivel sérico de Folato y Vitamina B₁₂ en adultos mayores chilenos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud ENS 2009-10

Título Abreviado: Nivel sérico de Folato y Vitamina B₁₂ en adultos mayores chilenos

**Cecilia Castillo-Lancellotti Cecilia¹, Paula Margozzini², Gonzalo Valdivia²,
Oslando Padilla², Ricardo Uauy^{3,4}, Jaime Rozowski⁵, Josep A. Tur^{1,6}.**

¹ Grupo de Investigación en Nutrición Comunitaria y Estrés Oxidativo. Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud. Universidad de las Islas Baleares. España.

² Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.

³ Unidad de Salud Pública y Nutrición, Laboratorio de Epidemiología Molecular. Instituto de Nutrición y Tecnología en Alimentos, Universidad de Chile. Santiago de Chile.

⁴ Departamento de Pediatría. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile

⁵ Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.

⁶ CIBERobn (Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición CB12/03/30038), Instituto de Salud Carlos III, España.

Correspondencia a: Dra. Cecilia Castillo L. Clínica Avansalud Avda. Salvador 100 2º
Piso Providencia, Santiago. Fono 56-2-3662000

Correo: dracastillo@gmail.com

Número de Tablas: 7

Recuento Palabras: 2514

Financiamiento del estudio: ENS 2009-10 fue financiada por el Ministerio de Salud de Chile. El financiamiento específico para las mediciones de ácido fólico y B12 en suero fue aportado por la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. La actividad de Tur JA ha sido parcialmente financiada por CIBERobn.

Resumen

Antecedentes: Niveles suprafisiológicos (NSF) de folato sérico (FS) derivados de la fortificación de harina con ácido fólico (AF) podrían determinar mayores riesgos en salud, especialmente, en adultos mayores con bajos niveles de vitamina B₁₂ (B₁₂).

Objetivo. Describir y analizar niveles FS y B₁₂ en adultos mayores chilenos e identificar grupos de riesgo.

Material y Método: 1043 adultos mayores (≥ 65 años) provenientes de muestra aleatoria estratificada multietápica, representativa nacional (Encuesta Nacional Salud, ENS 2009-10). Se determinó FS ($\mu\text{g/L}$) y B₁₂ (pg/ml) en ayunas (Inmunoensayo Competitivo Quimioluminiscencia Directa). Se calculó promedio, deciles y percentiles (P5 y 95). Se definieron categorías para FS: $<4,4$ (déficit); 4,41-20 (normal) y NSF: 20,01-25,6; 25,601-29 y >29 $\mu\text{g/L}$ (P80 muestra) y B₁₂: ≤ 200 (déficit); 200,01-299,5 (déficit marginal) y $>299,5$ (normal). Se calcularon prevalencias y modelos de regresión múltiple y logística ajustados por sexo, edad, nivel educacional(NEDU) y zona urbana/rural.

Resultados: Nivel promedio/P95 de FS y B₁₂: 21,2 ($\pm 0,56$)/38,6 $\mu\text{g/L}$ y 348,4 ($\pm 7,6$)/637 (pg/ml) respectivamente. 48,6% presentó NSF folato sérico; 0,3 % y 8,1% presentó déficit de folato y B₁₂. Prevalencia de NSF de FS $>29 \mu\text{g/L}$ fue significativamente inferior en hombres (OR ajustado=0,47 IC 0,26-0,84). B₁₂ no mostró variación significativa por edad y sexo. 4,1% del total presentó NSF de folato asociado a déficit de B₁₂. No se observa asociación estadísticamente significativa entre niveles de folato y vitamina B₁₂.

Conclusión: ENS 2009-10 ha permitido evaluar por primera vez efectos de la fortificación en adultos mayores. El déficit de FS es casi inexistente, sin embargo, un porcentaje importante muestra NSF que sugiere una revisión del nivel de fortificación de harina de trigo.

Palabras claves: ácido fólico, folato, vitamina B₁₂, adultos mayores, fortificación

Serum folate and vitamin B₁₂ in the elderly. Results from the Chilean National Health Survey 2009-10

Background: Supraphysiological levels (SFL) of serum folate (SF) derived from flour fortification with folic acid (FA) could determine major health risks in older adults who present low levels of vitamin B₁₂ (B₁₂).

Aim: To describe and analyze SF and B₁₂ levels in elderly Chileans and to identify risk groups.

Material and Methods: Participants were 1043 seniors (≥ 65 years old) from the National Health Chilean Health Survey 2009-2010 (ChNHS 2009-10), a multistage stratified random sample, representative of the national population. SF ($\mu\text{g/L}$) and B₁₂ (pg/ml) were determined in fasting samples (Competitive Chemoluminescence Immunoassay). Mean, deciles and percentiles 5 and 95th were calculated. We defined SF categories: <4.4 (deficit); 4.41-20 (normal) and SFL: 20.01-25.6; 25.6-29 and >29 $\mu\text{g/L}$ (80th percentile of the distribution) and vitamin B₁₂ categories: ≤ 200 (deficit); 200,1-299,5 (marginal deficit) and >299.5 (normal). Prevalence rates, multiple and logistic regression models were used and adjusted by sex and age, educational level and residence area.

Results: SF and B₁₂ mean and 95th percentil were 21.2 (± 0.56)/38.6 $\mu\text{g/L}$ and 348.4 ($\pm 7,6$)/637 (pg/ml) respectively. 48,6% presented folate SFL; 0,3% and 8,1% presented folate and B₁₂ deficiency. Men had significantly lower prevalence of SFL >29 $\mu\text{g/L}$ (OR adjusted 0.47 95% CI:0.26-0,84). B₁₂ showed no significant variation by age and sex. Prevalence folate SFL associated with B₁₂ deficiency was 4,1%. No statistically significant association was observed between levels of folate and B₁₂.

Conclusions: For the first time, ChNHS 2009-10 enabled the evaluation of effects of folic acid fortification in older adults. Folate deficit is almost unexistent, but a significant percentage had SFL suggesting the need for revising the current wheat flour fortification levels.

Keywords: folic acid, folate, vitamin B₁₂, elderly, fortification

Antecedentes

La fortificación obligatoria de la harina de trigo con ácido fólico se inició en Chile en el año 2002 (2-2,4 mg/kg) con el objetivo de reducir el número de recién nacidos con defectos de tubo neural (DTN) (1). Esta medida ha tenido un enorme impacto en la reducción de estas malformaciones congénitas (2), siendo evaluada como una intervención beneficiosa para la salud pública basada en su costo-efectividad (3).

Estudios recientes muestran que cerca de 20% de las muestras de harinas exceden los límites establecidos de fortificación (2). Estos altos niveles de ácido fólico en harina podrían determinar un incremento del folato sérico en niveles superiores a lo estimado, tal como se observa en otros países (4,5).

Se ha descrito que el incremento de folato sérico tendría un efecto protector en salud cuando existe un déficit previo en algunos tipos de cáncer como colon, mama y páncreas (6-8). Sin embargo, otros estudios sugieren que niveles elevados podrían determinar efectos adversos en salud también en relación a cáncer (9-13). En adultos mayores se ha descrito, además, una disminución de la función cognitiva cuando éstos presentan bajos niveles de folato sérico o cuando la elevación está asociada con un déficit de vitamina B₁₂ (14). Esta información plantea la necesidad de estudiar en Chile la presencia de niveles suprafisiológicos de folato sérico en distintos grupos de población, especialmente en embarazadas, niños y adultos mayores.

El objetivo de este estudio es describir y analizar los niveles séricos de folato y vitamina B₁₂ en adultos mayores chilenos provenientes de la Encuesta Nacional de Salud del año 2009-2010 (ENS 2009-10) e identificar potenciales subpoblaciones en riesgo para la salud a causa de estos niveles. Este estudio pretende aportar a la vigilancia epidemiológica nutricional y contribuir a la generación y evaluación de políticas de salud.

Material y Método

La muestra seleccionada comprende todos los adultos mayores (65 y más años) participantes de la ENS 2009-10 desarrollada entre octubre del año 2009 y septiembre de 2010 (15). La base de datos fue proporcionada por el Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud. Ésta corresponde a un estudio de prevalencia realizado en hogares en una muestra nacional, probabilística, estratificada y

multietápica de 5.412 personas mayores de 15 años con representatividad nacional, urbana, rural y regional. Para cada individuo se consideró un factor de expansión correspondiente al inverso de la probabilidad de selección del individuo, lo que permite corregir los resultados muestrales considerando la probabilidad desigual de selección de cada entrevistado dado el diseño muestral y la postestratificación demográfica según proyecciones censales a enero de 2010. El grupo de adultos mayores en ENS 2009-10 (1.043 individuos) fue especialmente sobrerrepresentado en el muestreo, con doble probabilidad de selección en el hogar a través de la tabla de Kish con el objetivo de obtener resultados de precisión estadística similar a los otros grupos de población. De éstos, 827 disponían de valores para folato sérico (FS) y 817 para vitamina B₁₂. Los valores extremos (>62,5 µg/L para folato sérico y >1.022 pmol/ml para vitamina B₁₂) fueron removidos para la descripción de los promedios y medianas nacionales (se excluyeron los valores 3 veces por sobre o bajo el rango intercuartil). Para el cálculo de las prevalencias no se excluyó ningún valor. Los participantes firmaron un consentimiento informado y sus resultados les fueron devueltos con recomendaciones y derivación según correspondía. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile (20).

Laboratorio

Las muestras de sangre fueron obtenidas por una enfermera entrenada en participantes con ayuno previo. Tecnólogos médicos de los laboratorios regionales de la red de Servicios de Salud centrifugaron y fraccionaron las muestras biológicas recibidas según protocolo, almacenándolas congeladas a -20° C hasta su traslado a Santiago para su análisis en el Laboratorio Central de la Pontificia Universidad Católica, debiendo cumplir con los controles de calidad interno del laboratorio y lo establecido según acreditación de la Norma Chilena 2.547 e ISO 15.189 (16). El 91% de las muestras fueron procesadas antes de 4 horas desde el momento de la punción venosa, previo a lo cual fueron mantenidas refrigeradas a 4°C. Los niveles séricos de folato y vitamina B₁₂ fueron determinados mediante inmunoensayo competitivo por quimioluminiscencia directa (ADVIA Centaur®).

Análisis Estadístico

La distribución percentilar considerando deciles y los percentiles (P) 5 y 95, así como los promedios de folato y vitamina B₁₂ sérico se analizaron según sexo y grupos de edad (65-74 años y ≥ 75 años). Los sujetos fueron categorizados en cuatro grupos según nivel de folato sérico ($\mu\text{g/L}$): $\leq 4,4$ (déficit) (17); 4,41 -20 (normal) y tres categorías de niveles definidos como suprafisiológicos considerando diferentes puntos de corte: 20,01- 25,6 según Dary O (17); 25,601-29 utilizado por Selhub et al. (18) y $>29\mu\text{g/L}$ correspondiente al percentil 80 de la distribución de la muestra. Se establecieron tres categorías de nivel sérico de vitamina B₁₂ (pg/ml): ≤ 200 (déficit); 200,1-299,5 (déficit marginal) y $>299,5$ (normal) (19). Se consideraron tres estratos de nivel educacional (NEDU): educación básica (≤ 8 años), media (8-12 años) y superior (≥ 12 años) y dos según zona de residencia (urbana y rural).

Las tasas de prevalencia y medias se calcularon utilizando los factores de expansión conforme al diseño complejo y ajustando la muestra a la demografía chilena a junio 2010. Se calcularon Odds Ratio ajustados por edad y sexo utilizando regresión logística y también modelos ANCOVA con intervalos de confianza 95%. Se utilizó el módulo de muestras complejas del programa SPSS v.17. El nivel de significancia fue definido como $p < 0,05$. Las tablas muestran prevalencias expandidas, sin embargo, los márgenes muestran el tamaño muestral del estrato.

Resultados

En la Tabla 1 se muestra las características de la muestra expandida. El 42,7% eran hombres, 82,1% provenía de zonas urbanas y 56,8% tenía un nivel educacional menor a 8 años de estudios.

En la tabla 2 y 3 se muestra la distribución percentilar y el promedio del nivel sérico de folato ($\mu\text{g/L}$) y vitamina B₁₂ (pg/ml) para hombres y mujeres y por grupo de edad. La mediana para ácido fólico en toda la población estudiada fue de 19,5 $\mu\text{g/L}$ y el promedio en hombres y mujeres de 20,1($\pm 0,71$) y 21,9 ($\pm 0,8$) $\mu\text{g/L}$ respectivamente. En el P5 y P95 se observa un nivel de folato de 8,6 y 9,3 $\mu\text{g/L}$ y de 35,2 y 40,6 $\mu\text{g/L}$ para hombres y mujeres, respectivamente. Aproximadamente 50% de la población estudiada presenta niveles considerados suprafisiológicos ($>20\mu\text{g/L}$) alcanzando un nivel de 38,6 $\mu\text{g/L}$ en el P95 de la población estudiada (Tabla 2). La mediana de vitamina B₁₂ para

esta población fue de 305 y 330 pg/ml, con un promedio de 325,4(\pm 10,84) y 346,6(\pm 10,82) pg/ml en hombres y mujeres respectivamente. Se observa que un 5% de los hombres y mujeres presentan además un nivel de vitamina B₁₂ deficitario(<200pg/ml)(Tabla 3).

La distribución porcentual según categorías de folato sérico y vitamina B₁₂ se muestran en las Tablas 3 y 4. Los OR crudo y ajustado según edad y sexo se presentan en la Tabla 5. Se observa que solo 0,3 % de la población estudiada presenta déficit de folatos. Un 51,1% presenta niveles normales y 48,6% presenta niveles suprafisiológicos (>20 μ g/L). Cuando se compara hombres y mujeres con niveles de folato suprafisiológicos >29 μ g/L, se observa que los hombres tienen prevalencias de niveles elevados significativamente menores que las mujeres (Tabla 3). Esta tendencia se mantiene al ajustar por todas las variables de control: edad, zona y NEDU (OR 0,47 IC 95% 0,26-0,84) (Tabla 5). En la Tabla 4 se muestra que 58,3% de la población estudiada presenta niveles normales de vitamina B₁₂ sérica, 33,6% déficit marginal y 8,1% déficit. Se observa que, entre los hombres, el 4,5 % del grupo de 65-74 años y el 11% de los \geq 75 años presentan déficit de vitamina B₁₂ (<200pg/L), mientras que en las mujeres se observa un déficit de 7,1% en el grupo de 65-74 años y de 12,1% en las de \geq 75 años. Según sexo, el 6,6% de los hombres y el 9,2 % de las mujeres presenta déficit de vitamina B₁₂. El análisis bivariado muestra que las mujeres \geq 75 años tienen una prevalencia de déficit marginal significativamente menor que los hombres (26,2% vs. 45,3%, p=0,037). Sin embargo, de manera global, no existen diferencias entre hombres y mujeres en cuanto al déficit marginal de vitamina B₁₂ cuando se desarrolla un análisis bivariado (29,5% vs. 39,3%, p=0,119), así como tampoco, al ajustar por edad, zona y NEDU (OR 1,55 IC 95% 0,88-2,76) (Tabla 5).

La información sobre el promedio de Vitamina B₁₂ sérica según las categorías de folato establecidas se muestra en la tabla 6. Tanto el análisis de varianza para comparar los niveles de vitamina B₁₂ según niveles de folato, como el análisis de regresión lineal muestran que no hay relación entre los valores de estas variables (p=0,828 y p=0,484 respectivamente). Este resultado se mantiene al ajustar por nivel educacional, sexo, zona y edad.

El porcentaje de adultos mayores en cada una de las categorías de folato según nivel de

vitamina B₁₂ se muestra en la Tabla 7. Del total de adultos mayores con déficit de vitamina B₁₂, un 51,7 % presentan niveles de folato suprafisiológicos y solo 0,3 % tiene asociado un déficit de folatos. Del total estudiado, 4,1% (55.367 adultos mayores) presenta un nivel suprafisiológico de folato sérico, asociado a un déficit de vitamina B₁₂. Por otra parte, de los que presentan un déficit marginal de vitamina B₁₂, un 48% presenta niveles de folato sérico sobre 20 µg/L. El análisis de Chi-cuadrado sobre esta tabla no muestra relación entre los niveles de folato y vitamina B₁₂, no encontrándose una asociación significativa para el modelo (p=0,268).

Discusión

Chile no ha desarrollado un sistema de monitoreo de folato sérico después de iniciada la fortificación de alimentos, así como tampoco, de vitamina B₁₂. Para efectos de comparación de niveles séricos de vitaminas durante la etapa pre y post-fortificación solo se encuentran disponibles algunos estudios transversales desarrollados en adultos mayores de la Región Metropolitana (21-23). La ENS 2009-10 es el primer estudio representativo que mide niveles séricos de folato y de vitamina B₁₂ en adultos mayores (15).

En un estudio transversal desarrollado en Santiago durante la pre-fortificación en 247 adultos mayores de nivel socioeconómico bajo, se observa un déficit de folato sérico de 55% en hombres y 33,1% en mujeres, con promedios de nivel sérico de 3,1 y 3,9 µg/L respectivamente (21). Aunque no son estudios metodológicamente comparables, los resultados de la ENS muestra niveles mayores de folato sérico, tanto en hombres como en mujeres, (20,1 y 21,9 µg/L respectivamente), mostrando el impacto de la fortificación con ácido fólico. Destaca además en el presente estudio, que el déficit de folatos es prácticamente inexistente.

Si bien en Chile no existe fortificación obligatoria de alimentos con vitamina B₁₂, se puede observar que el déficit de vitamina B₁₂ es menor (8,1%) que en estudios desarrollados en la etapa de prefortificación (55,1% en hombres y 30,9% en mujeres) y postfortificación (19,21), los cuales consideraban los mismos puntos de corte para definir déficit. Es probable que incorporando otros indicadores más sensibles para la identificación del déficit de vitamina B₁₂, tales como la determinación de ácido metil-

malónico y de holotranscobalamina, se pueda mejorar la pesquisa del déficit (24). A diferencia del estudio de Sánchez et al., en la ENS 2009-10 no se observan diferencias significativas entre hombres y mujeres después de ajustar por edad, sexo, zona y NEDU (19). El menor déficit encontrado podría ser explicado por un mayor consumo de alimentos aportadores de vitamina B₁₂, especialmente carnes (25) o bien a la entrega de alimentos fortificados (26).

Si bien en el mercado comercial existen diferentes tipos de alimentos fortificados con ácido fólico, la principal fuente la constituyen los elaborados con harina de trigo(27). Estudios que han evaluado el contenido de ácido fólico en harina muestran que alrededor de 20 a 30% de las muestras presentan un contenido superior a lo establecido(2,28). Esto podría explicar los elevados niveles de folato sérico encontrados en este estudio, donde un 48,6% presenta niveles suprafisiológicos (>20µg/L). Otros países que fortifican en forma obligatoria, también muestran incrementos del folato sérico, especialmente en adultos mayores (29). Se observa además, que 13,7% de los hombres y 25,2% de las mujeres presentan niveles especialmente elevados (>29µg/L). Es probable que este adultos pudieran corresponder a un subgrupo de población con mayor consumo de alimentos elaborados con harina de trigo, pero también podría asociarse a ingesta de multivitamínicos (30).

El análisis adicional de la base de datos de medicamentos de la ENS 2009-10 muestra que 4,7% y 3,2 % de los adultos mayores estudiados consumen suplementos vitamínicos conteniendo ácido fólico y vitamina B₁₂, siendo su consumo significativamente mayor en aquellos con niveles de folato sérico >20µg/L. Por otra parte, del total que no usan suplementos, 49,5% tienen niveles de folatos considerados suprafisiológicos, lo cual sugiere vigilar la política de fortificación más estrechamente.

En el presente estudio solo se determinó folato sérico total, sin embargo, considerando que cerca de la mitad de los adultos mayores presenta niveles suprafisiológicos, sería recomendable determinar la presencia de ácido fólico libre considerando las implicancias en salud. Se ha descrito que cuando los niveles de folato sérico son elevados, un porcentaje variable corresponde a ácido fólico sin metabolizar (31). Su presencia podría ser explicada por diversos factores tales como ingestas dietarias superiores a 400 µg/día (32), limitada conversión a tetrahidrofolato derivada de la

rápida saturación de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR)(33) y por la existencia de polimorfismos, que determinan una menor actividad enzimática (34). Es decir, la presencia de ácido fólico circulante podría ser más relevante en ciertas poblaciones quienes responderían de manera distinta dependiendo del tiempo y la dosis ingerida. Algunos estudios, pero no todos (6), sugieren (11,34-36) que niveles elevados de folato sérico, especialmente como ácido fólico, podría promover el crecimiento de algunos cánceres o de lesiones preexistentes. Un metanálisis reciente, con seguimiento durante cinco años, no mostró una mayor incidencia (37). Estudios recientes describen además, un aumento en el deterioro en el sistema nervioso central, especialmente asociado a deficiencia de vitamina B₁₂ (12). Al parecer existiría una interacción clave entre vitamina B₁₂ y folato en la síntesis de metionina desde la homocisteína a través de la enzima metionina sintetasa, en los cuales el 5-metil-tetrahidrofolato y la vitamina B₁₂ actúan como cofactores. Se especula que el exceso de ácido fólico y sus metabolitos actuarían como aceptores de electrones (oxidantes), exacerbando la deficiencia de vitamina B₁₂ de manera semejante a lo observado en la exposición a óxido nítrico(38). En algunos estudios se ha descrito que en individuos con mayores niveles de folato sérico se exacerbaría el déficit de vitamina B₁₂ (18, 39). En nuestro estudio, al igual que en el estudio de Mills JL et al.(40) no se observa diferencias significativas en los niveles de vitamina B₁₂ considerando diferentes categorías de folatos.

En resumen, el déficit de folatos observado en Chile es mínimo, sin embargo, un porcentaje importante de la población presenta niveles suprafisiológicos sugiriendo la conveniencia de establecer un sistema de vigilancia para evaluar y limitar los probables riesgos en salud, adecuando la fortificación de alimentos.

Referencias

1. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Programas de Fortificación de alimentos. Disponible en http://www.minsal.gob.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_alimentos/prot_fortificacion.html [Consultado el 6 de mayo de 2013]
2. Castillo-Lancellotti C, Tur JA, Uauy R. Impact of folic acid fortification of flour on neural tube defects: a systematic review. *Public Health Nutr* 2012; 31:1-11.
3. Llanos A, Hertrampf E, Cortes F, Pardo A, Grosse SD, Uauy R. Cost-effectiveness of a folic acid fortification program in Chile. *Health Policy* 2007; 83 (2-3): 295-303.
4. Pfeiffer CM, Hughes JP, Lacher DA, Bailey RL, Berry RJ, Zhang M et al. Estimation of trends in serum and RBC folate in the U.S. population from pre- to postfortification using assay-adjusted data from the NHANES 1988-2010. *J Nutr* 2012;142(5): 886-93.
5. Ray JG, Vermeulen MJ, Boss SC, Cole de. Increased red cell folate concentrations in women of reproductive age after Canadian folic acid food fortification. *Epidemiology* 2002; 13(2): 238-40.
6. Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Fuchs C, Rosner BA, et al. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. *Ann Intern Med* 1998; 129 (7): 517-24.
7. Shrubsole Mj, Jin F, Dai Q, Shu Xo, Potter Jd, Hebert Jr, et al. Dietary folate intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Res* 2001; 61(19): 7136-41.
8. Chuang SC, Stolzenberg-Solomon R, Ueland PM, Vollset SE, Midttun Ø, Olsen A et al. A U-shaped relationship between plasma folate and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Eur J Cancer* 2011; 47(12):1808-16.
9. Kim YI Folate and colorectal cancer: An evidence-base critical review. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51(3): 267-92.
10. Stolzenberg-Solomon RZ, Chang SC, Leitzmann MF, Johnson KA, Johnson C, Buys SS, et al. Folate intake, alcohol use, and postmenopausal breast cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(4): 895-904

11. Tomaszewski JJ, Cummings JL, Parwani AV, Dhir R, Mason JB, Nelson JB et al. Increased cancer cell proliferation in prostate cancer patients with high levels of serum folate. *Prostate* 2011; 71(12): 1287-93.
12. Ly A, Hoyt L, Crowell J, Kim YI. Folate and DNA methylation. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 17(2): 302-26
13. Sweeney MR, McPartlin J, Scott J. Folic acid fortification and public health: report on threshold doses above which unmetabolised folic acid appear in serum. *BMC Public Health* 2007; 7:41.
14. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors. *Am J Clin Nutr* 2010; 91(6): 1733-44
15. Gobierno de Chile Ministerio de Salud. *Encuesta Nacional de Salud ENS 2009-2010* Disponible en www.redsalud.gov.cl [Consultado el 6 de septiembre de 2012]
16. Pontificia Universidad Católica de Chile. Políticas de Calidad de Laboratorios Clínicos. Disponible en <http://redsalud.uc.cl/link.cgi/MS/Laboratorios/Somos/2626> [Consultado el 6 de septiembre de 2012]
17. Dary O. Nutritional interpretation of folic acid interventions. *Nutr Rev* 2009; 67(4): 235-44.
18. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr* 2007; 85(1): 193-200.
19. Sánchez H, Albala C, Hertrampf E, Verdugo R, Lavados M, Castillo JL et al. Prevalence of vitamin B-12 deficiency in older adults. *Rev Med Chile* 2010; 138(1): 44-52.
20. Pappas G, Hyder A. Exploring ethical considerations for the use of biological and physiological markers in population-based surveys in less developed countries. *Global Health* 2005; 1: 16. doi: 10.1186/1744-8603-1-16
21. Olivares M, Hertrampf E, Capurro MT, Wegner D. Prevalence of anemia in elderly subjects living at home: role of micronutrient deficiency and inflammation. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54(11): 834-9.

22. Hirsch S, de La Maza P, Barrera G, Gattás V, Petermann M, Bunout D. The Chilean flour folic acid fortification program reduces serum homocysteine levels and masks vitamin B₁₂ deficiency in elderly people. *J Nutr* 2002; 132(2): 289-91.
23. Sánchez H, Albala C, Hertrampf E, Verdugo R, Lavados M, Castillo JL et al. Prevalence of vitamin B₁₂ deficiency in older adults. *Rev Med Chile* 2010; 138(1): 44-52.
24. Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B₁₂ status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Am J Clin Nutr*. 2011; 94(2): 666S-72S.
25. Crovetto M, Uauy R. Changes in processed food expenditure in the population of Metropolitan Santiago in the last twenty years. *Rev Med Chil* 2012; 140(3): 305-12.
26. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Programa de Alimentación Complementaria del Adulto Mayor. PACAM. Disponible en: http://www.redsalud.gov.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_alimentos/prot_pan.html [Consultado el 23 agosto de 2012].
27. Olivares S, Bustos N, Lera L, Zelada Me. Estado nutricional, consumo de alimentos y actividad física en escolares mujeres de diferente nivel socioeconómico de Santiago de Chile *Rev Med Chil* 2007; 135: 71-78.
28. Castillo C, Tur JA, Uauy R. Fortificación de la harina de trigo con ácido fólico en Chile. Consecuencias no intencionadas. *Rev Med Chile* 2010; 138(7): 832-40.
29. Vanderwall CM, Tangney CC, Kwasny MJ, Gustashaw KA. Examination of circulating folate levels as a reflection of folate intakes among older adult supplement users and nonusers in the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *J Acad Nutr Diet* 2012; 112(2): 285-90.
30. Boilson A, Staines A, Kelleher CC, Daly L, Shirley I, Shrivastava A et al. Unmetabolized folic acid prevalence is widespread in the older Irish population despite the lack of a mandatory fortification program. *Am J Clin Nutr* 2012; 96(3): 613-21.
31. Sweeney Mr, MC Partlin J, Scott J. Folic acid fortification and public health: report on threshold doses above which unmetabolised folic acid appear in serum.

BMC Public Health 2007; 7: 41

32. Bailey SW, Ayling JE. The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(36): 15424-9
33. Thomas P, Fenech M. Methylenetetrahydrofolate reductase, common polymorphisms, and relation to disease. *Vitam Horm* 2008;79: 375-9
34. Cole BF, Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Ahnen DJ, Bresalier RS, et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA* 2007; 297: 2351-9.
35. Mason JB, Dickstein A, Jacques PF, Haggarty P, Selhub J, Dallal G et al. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1325-9
36. Hirsch S, Sanchez H, Albala C, Maza MP, Barrera G, Leiva L et al. Colon cancer in Chile before and after the start of the flour fortification program with folic acid. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 436-9
37. Vollset SE, Clarke R, Lewington S, Ebbing M, Halsey J, Lonn E et al. Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: meta-analyses of data on 50 000 individuals. *Lancet*. 2013; S0140-6736(12)62001-7.
38. Reynolds EH. Benefits and risks of folic acid to the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 72: 567-571
39. Selhub J, Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH. Folate-vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. *Am J Clin Nutr* 2009; 89:702S-6S.
40. Mills JL, Carter TC, Scott JM, Troendle JF, Gibney ER, Shane B, et al. Do high blood folate concentrations exacerbate metabolic abnormalities in people with low vitamin B-12 status? *Am J Clin Nutr* 2011;94(2): 495-500.

Tabla 1. Descripción de la muestra

N(n)	Grupos de Edad (años)		Total
	65-74	≥75	
Hombres			
Muestra expandida (Muestra real)	436.266 (216)	233.299 (138)	669.565 (354)
%	45,4	38,5	42,7
Mujeres			
Muestra expandida (Muestra real)	524.799 (304)	372.660 (261)	8974.59 (565)
%	54,6	61,5	57,3
Urbano %	81,4	83,1	82,1
Escolaridad			
<8 años %	52,7	63,3	56,8
8-12 años %	28,3	30,4	29,1
>12 años %	19,0	6,3	14,1

Tabla 2. Distribución percentilar del nivel sérico de folato y vitamina B₁₂ en adultos mayores chilenos, ENS 2009-10

Folato sérico (µg/L)	P5	P10	P20	P30	P40	P5	P60	P70	P80	P90	P95	Promedio
Hombres												
65-74	10,9	12,9	13,8	15,3	17,6	19,8	22,2	22,9	24,0	29,7	33,5	20,0
≥75 años	6,7	10,5	11,5	15,4	17,3	18,8	20,6	23,5	27,0	33,0	37,1	20,2
Total Hombres	8,6	11,1	13,6	15,3	17,3	19,5	21,5	22,9	24,4	30,5	35,2	20,1
Mujeres												
65-74	9,6	12,0	13,7	15,3	17,6	19,5	22,3	26,4	30,4	34,6	37,0	21,5
≥75 años	8,8	10,1	14,5	15,0	17,5	19,6	23,3	27,7	29,8	40,5	42,9	22,4
Total Mujeres	9,3	11,3	13,9	15	17,6	19,5	22,5	26,8	30	34,9	40,6	21,9
Total**	9,3	11,3	13,6	15,1	17,5	19,5	22,1	24	29	33,6	38,6	21,2
Vitamina B₁₂												
(pg/mL)	P5	P10	P20	P30	P40	P50	P60	P70	P80	P90	P95	Promedio
Hombres												
65-74	203	211	236	269	290	311	350	384	432	477	514	333,7
≥75 años	141	199	216	229	245	259	310	354	444	480	533	308,9
Total Hombres	177	207	229	252	275	305	334	384	432	477	533	325,4
Mujeres												
65-74	196	207	224	263	301	330	345	397	455	536	656	358,4
≥75 años	173	186	230	263	298	336	371	409	514	595	750	373,1
Total Mujeres	179	198	230	263	299	330	361	404	487	579	701	346,6
Total**	179	204	229	259	290	319	345	397	444	532	637	348,4

**Nivel sérico de folato y vitamina B12 según percentil calculado en el total de la muestra expandida

Tabla 3. Prevalencia de de adultos mayores según sexo y grupo de edad con niveles .

^a Test χ^2 para muestras expandidas Diferencia entre sexos en ≥ 75 años, $p=0,045$

		Folato sérico ($\mu\text{g/L}$)					
Hombres	<4,40	4,41-20	20,01-25,6	25,6-29	>29	Total	
<i>65-74 años</i>							
Muestra real (n)	-	97	46	20	29	192	
Muestra expandida (n)	-	189.337	116.986	25.235	48.822	380.380	
%	-	49,8	30,8	6,6	12,8	100,0	
<i>≥ 75 años</i>							
Muestra real (n)	2	56	28	10	25	121	
Muestra expandida (n)	373	98.371	38.751	15.761	2.832	181.577	
%	0,2	54,2	21,3	8,7	15,6	100,0	
<i>Total Hombres</i>							
Muestra(n)	2	153	74	30	54	313	
Muestra expandida (n)	373	287.707	155.738	40.996	77.144	561.958	
%	0,1	51,2	27,7	7,3	13,7 ^a	100,0	
<hr/>							
Mujeres	<4,40	4,410-20	20,01-25,6	25,60-29	>29	Total	
<i>65-74 años</i>							
Muestra real (n)	-	118	69	18	64	269	
Muestra expandida (n)	-	230.378	80.316	20.732	117.303	448.729	
%	-	51,3	17,9	4,6	26,1	100	
<i>≥ 75 años</i>							
Muestra real (n)	4	123	45	22	47	241	
Muestra expandida (n)	3.287	177.371	47.467	37.746	84.279	350.150	
%	0,9	50,7	13,6	10,8	24,1	100,0	
<i>Total Mujeres</i>							
Muestra real (n)	4	241	114	40	111	510	
Muestra expandida (n)	3.287	407.749	127.783	58.478	201.582	798.879	
%	0,4	51,0	16,0	7,3	25,2 ^a	100,0	
<hr/>							
<i>Total</i>							
Muestra real (n)	6	394	188	70	165	823	
Muestra expandida (n)	3.660	695.456	283.521	99.474	278.725	1.360.837	
%	0,3	51,1	20,8	7,3	20,5	100,0	

Tabla 4. Prevalencia de de adultos mayores según sexo y grupo de edad que presentan déficit, déficit marginal y niveles normales de Vitamina B₁₂, ENS 2009-10.

Vitamina B ₁₂ (pg/ml)				
Hombres	<200	200-299,5	>299,5	Total
<i>65-74 años</i>	24	76	92	192
Muestra(n)	17.095	139.556	226.896	383.548
Muestra expandida (n)	4,5	36,4	59,2	100,0
%				
<i>≥75 años</i>				
Muestra (n)	18	50	55	123
Muestra expandida (n)	20.139	83.036	80.249	183.424
%	11	45,3 ^a	43,8	100,0
<i>Total Hombres</i>				
Muestra (n)	42	126	147	315
Muestra expandida (n)	37.234	222.592	307.145	566.972
%	6,6	39,3	54,2	100
Mujeres	<200	200-299,5	>299,5	Total
<i>65-74 años</i>				
Muestra real (n)	23	65	176	264
Muestra expandida(n)	31.874	143.582	274.907	450.363
%	7,1	31,9	61,0	100,0
<i>≥75 años</i>				
Muestra real (n)	26	63	144	233
Muestra expandida (n)	40.328	87.547	206.301	334.176
%	12,1	26,2 ^a	61,7	100,0
<i>Total Mujeres</i>				
Muestra real (n)	49	128	320	497
Muestra expandida (n)	72.202	231.129	481.208	784.539
%	9,2	29,5	61,3	100,0
<i>Total</i>				
Muestra real (n)	91	254	467	812
Muestra expandida (n)	10.943	453.721	788.354	1.351.512
%	8,1	33,6	58,3	100,0

Tabla 5. Odds Ratio de Prevalencia para niveles normales, deficitarios y suprafisiológicos de ácido fólico según edad, sexo y nivel educacional, ENS 2009-10.

Folato sérico (□g/L)		OR Crudo	IC 95%	OR Ajustado ^a	IC 95%
<4	Edad	-		-	-
	Sexo	0,16	0,018-1,47	-	-
4,41-20	Edad	1,05	0,64-1,73	1,07	0,66-1,73
	Sexo	1,01	0,59-1,72	1,01	0,60-1,71
>20	Edad	0,93	0,56-1,53	0,91	0,56-1,47
	Sexo	1,01	0,59-1,72	1,0	0,59-1,68
>25,6	Edad	1,32	0,77-2,26	1,15	0,68-1,94
	Sexo	0,55	0,32-0,96	0,57	0,34-0,997
>29	Edad	1,07	0,59-1,95	0,93	0,52-1,69
	Sexo	0,47	0,26-0,86	0,47	0,26-0,84
Vitamina B₁₂ (pg/ml)					
<200	Edad	2,12	0,98-4,06	1,84	0,82-4,13
	Sexo	0,69	0,32-1,49	0,82	0,39-1,71
200-299,5	Edad	0,96	0,57-1,62	1,0	0,60-1,69
	Sexo	1,55	0,89-2,68	1,55	0,88-2,76

^aGrupos de referencia para el cálculo de odds ratios ajustados: mujeres, edad ≥ 75 años; zona urbano; nivel educacional alto: >12 años estudios.

Tabla 6. Nivel sérico de Vitamina B₁₂* según categorías de de folato * en adultos mayores, ENS 2009-10.

Nivel sérico de ácido fólico (□g/L)					
Nivel sérico *	421,8	391,4	439,3	364,2	383,9
Vitamina B ₁₂					
IC 95%	332,4-511,1	351,2-471,5	308,6-570,1	281,1-443,3	343,6-424,3
Error Típico	45,5	20,4	66,6	42,3	20,5

*promedio. ANOVA: p=0,484 NS

Tabla 7. Distribución de adultos mayores según nivel de sérico de folato y niveles sérico de vitamina B₁₂, ENS 2009-10.

N Folatos (µg/L)	Vitamina B ₁₂ (pg/ml)							Total %		
	N (n)*	< 200 %	N (n)*	200-299,5 %	N (n)*	>299,5 %	N (n)*			
u e s t r a e p a n	< 4,41	357(1)	0,3	16(1)	0,0	3.287(4)	0,4	3.660(6)	0,3	
	4,41-20	51.323 (37)	47,9	235.940 (122)	52,0	391.196 (223)	50,5	678.459 (382)	50,8	
	20,01-25,6	15.598 (19)	14,6	99.512 (64)	21,9	159.669 (97)	20,6	274.779(180)	20,6	
	25,601-29	11.830 (11)	11,0	50.443 (22)	11,1	37.201 (37)	4,8	99.474 (70)	7,5	
	x p a n	>29	27.949 (22)	26,1	67.483 (44)	14,9	183.293 (99)	23,7	278.725 (165)	20,9
	Total	107.958 (90)	100	453.393 (253)	100	774.647(460)	100	1.335.097(803)	100	

ida; (n)=muestra real; Test χ^2 para muestras expandidas p=0,268 NS

Manuscrito VIII

Castillo Lancellotti C, Margozzini P, Valdivia G, Padilla O, Rozowski J, Uauy R,

Tur JA.

Serum Folate, Vitamin B₁₂ and cognitive impairment in Chilean older adults.

(Remitido para su publicación)

Serum Folate, Vitamin B₁₂ and cognitive impairment in Chilean older adults

Cecilia Castillo-Lancellotti ¹, Paula Margozzini ², Gonzalo Valdivia², Oslando Padilla ², Ricardo Uauy^{3,4}, Jaime Rozowski ⁵, Josep A. Tur^{1,6}.

¹Research Group on Community Nutrition and Oxidative Stress. University of the Balearic Islands, 07122 Palma de Mallorca, Spain

²Department of PublicHealth, Faculty of Medicine. Pontifical Catholic University of Chile.

³Public Health and Nutrition Unit, Laboratory of Molecular Epidemiology. Institute of Nutrition and Food Technology, University of Chile. Santiago de Chile.

⁴Department of Pediatrics. Faculty ofMedicine. Pontifical Catholic University of Chile.

⁵Department of Nutrition, Diabetes and Metabolism. Faculty ofMedicine. Pontifical Catholic University of Chile.

⁶CIBERobn (Physiopathology of Obesity andNutrition CB12/03/30038), Instituto Carlos III, Spain.

Corresponding author (✉)

Cecilia Castillo-Lancellotti.

Fleming 6711 Las Condes Santiago, Chile.

Phone: 56-2-23421739 Fax 56-2-2342 1739

e-mail: dracastillo@gmail.com

Running title:Serum Folate, Vitamin B₁₂and cognitive function

Keywords: Folic acid, Vitamin B₁₂, cognition, elderly, Chile

Objective: To analyse the relationship between serumfolate (SF), vitamin B₁₂ (B₁₂) and impaired cognitive function (ICF) in Chilean elderly.

Setting: Chile.

Design: 1051 older adults (>65 years) drawn from representative households of the national prevalence study were assessed utilising Modified Mini Mental Status Examination (MMMSE and MMMSE plus Pfeffer Functional Activity Questionnaire (PFAQ) to analyse the relationships between ICF and age, SF (µg/L) and vitamin B₁₂ (pg/ml) (Student-t Test), as well as gender, educational level (EDUL), residence area, diabetes and hypertension (Chi-square). Multiple logistic regressions with interactions were estimated to assess the impact of SF on ICF according these two methods.

Results: Multivariate model using MMMSE demonstrated an increased ICF risk for seniors who had hypertension, diabetes and higher B₁₂ levels. SF and its square (SF²) were statistically significant, indicating that this ICF predictor displays an U-shaped distribution. Interaction between SF and B₁₂ was not statistically significant. A second model utilising MMMSE/PFAQ suggested that urban residence decreased the risk, while male, older age, B₁₂ and hypertension increased the risk. The variables SF and SF² and the SF*B₁₂ interaction were statistically significant (P<0.05). One-unit increase in SF (1 µg/L) decreased ICF risk at very low levels of FS and high levels of B₁₂. An increase in FS raised the risk when FS were very high and B₁₂ low (OR≈1.4).

Conclusion: These findings suggest the need to re-evaluate the level of folic acid in fortified flour to prevent the increased risk of ICF observed at both extremes of the SF distribution.

Introduction

Numerous studies have described the importance of nutrition in the maintenance of cognitive function ⁽¹⁾. Folate, along with other B vitamins, especially B₁₂, play important roles in the modulation of gene expression and synthesis of deoxyribonucleic acid (DNA) as determinants of the detoxification of homocysteine and neurotransmitter synthesis ^(2, 3). Deficiencies in folate and vitamin B₁₂ reduce S-adenosyl-methionine (SAM) and increase plasma homocysteine, which contributes to cognitive decline through the oxidation of the functional and structural proteins of neurons and the endothelium ⁽⁴⁾ and the inhibition of methylation-dependent reactions, including neurotransmitter synthesis ⁽⁵⁾.

Folic acid supplementation has a positive effect on the cognitive function of older adults when they have deficient levels of serum folate (SF) ^(6, 7). Moreover, high levels of SF combined with low levels of vitamin B₁₂ are associated with further cognitive deterioration ⁽⁸⁻¹¹⁾.

Studies conducted in Chile during the implementation of wheat flour fortification have demonstrated increased levels of SF in the elderly and have revealed that about approximately 50% of subjects presented with supraphysiological levels (>20 µg/L) ^(12,13). Therefore, the goal of this study is to analyse and compare the relationship between SF and ICF in older Chilean adults utilising data from the National Health Survey (NHS 2009-2010) ⁽¹⁴⁾.

Material and Methods

Subjects

This study evaluated 1051 older adults (>65 years of age) who participated in the 2009-2010 National Health Survey (NHS 2009-10) ⁽¹⁴⁾, which utilised a national, probabilistic, stratified, multistage sample of 5412 people older than 15 years of age. The sample was representative at the national, urban, rural and regional levels. Each adult was randomly selected within the household utilising the Kish method. For each individual, an expansion factor was considered, which corresponded to the inverse of the probability of selection of that individual and allowed the results of the sample

selection to incorporate the unequal selection probability for each respondent given the sample design and demographic post-stratification according to January 2010 census projections. Older adults (> 65 years) were particularly overrepresented in the sample to obtain statistically significant results comparable to the other age groups. Of these respondents, 851 had recorded values for SF and 824 for vitamin B₁₂. Outliers, corresponding to values exceeding three times the interquartile range from the median (>62.5 mg/L for SF and >1022 pmol/ml for vitamin B₁₂) were excluded from the mean calculations (22 cases for vitamin B₁₂ and 4 for SF).

The Research Ethics Committee of the School of Medicine (Chilean Pontifical Catholic University) approved the study protocol. All participants provided signed informed consent.

Biochemical Measurements.

The samples of serum folate and vitamin B₁₂ were obtained from fasting individuals by a trained registered nurse. The collection was standardised according to the NHS 2009-10 manual⁽¹⁴⁾. The country's laboratories centrifuged and aliquoted biological samples received per protocol and stored them frozen or chilled according to these standards. All samples were transported at -4°C to regional hospitals. The serum samples were frozen at -20°C and sent to the Central Laboratory of the Chilean Pontifical Catholic University for centralised analysis complying with internal quality controls⁽¹⁵⁾. Of the samples, 91% were processed within 4 hours of venipuncture. Serum folate levels (µg/L) and vitamin B₁₂ (pg/ml) were determined by competitive immunoassay using direct chemiluminescence (ADVIA Centaur®).

Assessment of Cognitive Function

A trained nurse in the older adults' home assessed cognitive function. First, the Modified Mini Mental State Examination (MMSE) instrument that assesses orientation, attention, recent memory and language was utilised. The MMSE consists of 6 questions worth a maximum of 19 points^(16, 17), and a cut-off of ≤ 13 points identified cognitive impairment^(18, 19). To improve the identification of impairment, individuals with an altered MMSE score were then assessed utilising the Pfeffer Functional Activities Questionnaire (PFAQ)⁽²⁰⁾. This assessment consists of 11

questions, which were answered by a family member or caregiver, to assess the functional status and degree of daily dependence of the older adult. A score ≥ 6 points indicates impairment in the performance of daily activities.

Control Variables

The following control variables were considered: age; gender; educational level (EDUL) (where basic represents ≤ 8 years of schooling, medium between 8 to 12 years, and highly educated ≥ 12 years); area of residence (urban or rural), as defined by the Chilean National Institute of Statistics ⁽²¹⁾; and the presence of diabetes mellitus (DM) and hypertension.

Only participants for whom blood samples were taken after at least 8 hours fasting were included in the DM investigation. Blood glucose was analysed as a continuous variable, and extreme values > 300 mg/dl were excluded. Subjects with fasting blood glucose levels ≥ 126 mg/dl or a reported physician diagnosis of DM were considered diabetic ^(14, 22). Three blood pressure measurements were performed during a single morning visit while fasting after resting for 5 minutes at two minutes intervals. Each measurement was timed and conducted by a validated automated device (Omron HEM 742 ®) ⁽²³⁾. A high blood pressure cut-off of $\geq 140/90$ mmHg consistent with the VI Joint National Committee ⁽²⁴⁾ guidelines was utilised. Normotensive individuals who reported drug treatment in the questionnaire were also considered.

Statistical Analysis

A Student's t test compared older adults with and without impaired cognitive function employing the MMMSE and MMMSE plus PFAQ for the following continuous variables: age, serum folate and vitamin B₁₂ levels. A Chi-square test examined the association of cognitive impairment with gender, EDUL, area of residency, DM and hypertension.

A detailed analysis of the association between the risk of impaired cognitive function in older adults in relation to the levels of SF, vitamin B₁₂ and the control variables was performed utilising multiple logistic regression. Squares of serum folate levels (SF²) were also included because both very low and very high levels may be risk factors ⁽¹⁰⁾.

Interactions between FS and vitamin B₁₂ with the control variables (age, sex, area of residence, EDUL, hypertension and DM) and the interaction between FS and vitamin B₁₂ themselves were also examined.

For age, ORs were calculated for each 5-year increment; for SF, for every 1 µg/L unit change; and for vitamin B₁₂, for every 10 pg/ml change. The following are the reference categories for the categorical variables: for gender, women; for EDUL, highly educated (> 12 years of studies); for area of residency, urban region; and for DM and hypertension, absence of these diseases.

However, quadratic variables and interactions in logistic regression models are not interpretable as ORs; therefore, there are omitted because the changes in the risk of cognitive impairment occur as the level of these variables change. Note that changes in the levels of these variables also affect the quadratic and interaction terms. The risk calculations for these variables incorporate the estimates of these variables, their quadratic and/or interactions term but these do not correspond to a single value because they change for each value of that variable. Given the above, as it is not possible to summarize the ORs of these variables through a single value, graphics have been drawn, describing the ORs change in terms of them.

The varying probabilities of presenting with cognitive impairment according to the screening tests (MMSE and MMSE plus PFAQ) are presented as a function of folate levels for subjects with different characteristics. Two figures present the change in risk of impaired cognitive function by SF level (because SF and SF² are not independent variables). The probability of cognitive impairment was calculated from the logistic regression coefficients.

Finally, a two-dimensional figure with shaded areas representing different ORs presents the impairment of cognitive function according to the MMSE plus PFAQ. This figure identifies the levels of FS and vitamin B₁₂ for which a one-unit change in FS (1 µg/L) produces a significant change in the risk of impaired cognitive function as well as the values for which the risk is not significant. To establish statistical significance for each combination of FS and vitamin B₁₂, the OR was calculated with a 95% confidence interval, estimates of the variance and covariance of the coefficients. This analysis was performed utilising the R environment for Windows, version 3.0.1. All other analyses

were conducted utilising the complex samples module (SPSS v.17.0.0 programme). The level of significance was defined as $P < 0.05$.

Results

The characteristics of individuals with normal and impaired cognitive function are displayed in Tables 1 and 2. When the analysis of normal and altered MMMSE scores was performed, the subjects with cognitive impairment were considerably older and had higher levels of vitamin B₁₂, and these values were significantly higher than the levels observed in normal subjects.

Subjects with lower levels of EDUL exhibit greater prevalence of cognitive impairment (25.9%) than those with medium or high EDUL (7.5 and 3.3%, respectively). Those living in rural areas display a higher prevalence of cognitive impairment compared to those living in urban areas (32.7 versus 14.5%). Moreover, the prevalence of cognitive impairment is higher among hypertensive individuals (19.5%) (Table 1).

When the information in Table 2 (MMMSE plus PFAQ) is compared to Table 1 (MMMSE), differences by age and serum vitamin B₁₂ levels are insignificant because estimates for subjects with cognitive deficits produce much larger standard errors. Those with impaired cognitive function (MMMSE plus PFAQ) have SF levels below those found in individuals with impaired cognitive function evaluated only with the MMMSE. A significant difference in the mean levels of SF of normal individuals and those with impaired cognitive function when both tests are applied is observed. As observed with the MMMSE, when both evaluation criteria are utilised, a higher prevalence of cognitive impairment was observed in subjects with low EDUL (10.2% versus 2.3% at the medium level and 0.8% at the high level). Table 2 demonstrates that cognitive impairment is higher in rural areas than urban areas; however, the estimate is not statistically significant. The differences in gender are more pronounced when evaluated utilising both tests than with the MMMSE alone; these results are not statistically significant. A similar pattern is observed with hypertension.

Table 3 presents multivariate logistic models of cognitive impairment for both MMMSE and MMMSE plus PFAQ. In the first model (MMMSE), a significant increase in the risk of subjects with basic EDUL (OR= 5.0; 95% CI 1.17, 21.35) as well as those with

hypertension (OR= 2.96; 95% CI 1.29, 6.79), DM (OR= 2.49; 95% CI 1.09-5.71), older age (OR= 1.06; 95% CI 1.009, 1.12) and higher levels of vitamin B₁₂ (OR= 1.002; 95% CI 1.000, 1.003) was identified. Both SF and SF² are significant but their OR are omitted as justified above because the square of SF in the logistic regression changes the risk expressed by the OR at different folate levels of each unit change in FS (1 µg/L). Increases in SF below 19.02 µg/L produce significant decreases in the risk of ICF (confidence intervals are entirely below 1). However, for values above this threshold, changes in SF do not significantly affect the risk of cognitive impairment in terms of MMMSE. For example, SF level of one unit from 4 µg/L to 5 µg/L decreases the risk of ICF by approximately 12%; a SF increases from 10 to 11 µg/L decreases risk by approximately 9%. Conversely, a SF level increase from 40 to 41 µg/L increases the risk by 7%.

Figure 1 displays the probability of developing cognitive impairment as a function of SF level in individuals with different profiles, which allows interpretations of the change in risk of cognitive impairment produced by a change in SF. A U-shaped curve is observed where the lowest risk is observed for SF levels of approximately 25 µg/L while an increased risk is observed for extreme values of SF. The lowest risk profile corresponds to a 65-years old subject with higher education, no hypertension or diabetes and normal values of vitamin B₁₂, while the highest risk corresponds to an 85-years old subject with basic EDUL, diabetes, hypertension and a vitamin B₁₂ serum level of 600 pg/ml.

The second model presented in Table 3 (MMMSE plus PFAQ) indicates that individuals living in urban areas are at significantly lower risk than those living in rural areas (OR= 0.21; 95% CI 0.06, 0.68). The highest risk was observed in men (OR= 4.59; 95%, CI 1.72, 12.26), in those who are older (OR= 1.54; 95% CI 1.04, 2.28) and in diabetics (OR= 3.43; 95% CI 1.07, 10.97). Furthermore, hypertensive patients tend to experience an increased risk that is statistically insignificant (OR= 5.56; 95% CI 0.85, 36.25); however, its inclusion is important to improve goodness of fit. The ORs for folate, SF² and vitamin B₁₂ have been omitted because they are dependent on the values of at least one of the two variables (as previously explained).

Figure 2 displays the probabilities of developing cognitive impairment according to the MMMSE plus PFAQ criterion as a function of the SF level for subjects with different characteristics. As in Figure 1, the probability of impaired cognitive function according to both cognitive assessment tests is described by a U-shaped curve with the lowest risk at serum folate levels of approximately 29.9 µg/L for some profiles and 41.7 g/L for other profiles. The greatest risk corresponds to a hypertensive, diabetic male aged 85-years living in a rural area with a vitamin B₁₂ serum level of 600 pg/ml, and the lowest risk is a non-hypertensive, non-diabetic woman aged 65 years living in an urban area with a vitamin B₁₂ level of 190 pg/ml. In this model, an increase in cognitive impairment is associated with an increased level of vitamin B₁₂ for SF levels below 20.62 µg/L, with no significant changes beyond this level.

Figure 3 displays the differences in the risk of impaired cognitive function according to the MMSE plus PFAQ that is produced by a one-unit increase in SF (1 µg/L) for each combination of SF and vitamin B₁₂. Each grey area represents a different OR level. The upper left corresponds to very low folate values and very high vitamin B₁₂ levels; an increase in one unit of SF decreases the risk by approximately 40% (approximately OR of 0.6). The central white region corresponds to values of SF and vitamin B₁₂ for which the change in one unit (1 µg/L) of SF does not significantly change the risk. The lower right represent very high FS and low vitamin B₁₂ values and indicate that a one unit increase in FS increases risk (approximately OR of 1.4).

Discussion

Folate plays important roles in growth, differentiation, development, brain repair, cognition, mood, and ageing⁽²⁵⁾. In this study, assessment of cognitive function was conducted utilising the MMMSE, which is a modified screening tool to evaluate cognitive deficits. It was validated in Chile to limit bias when subjects are illiterate or possess limited literacy^(16, 19). A total score of ≤ 13 indicated assessment with the PFAQ, which improved the positive predictive value^(19, 20).

A significant percentage of the sample presents with impaired cognitive function when evaluated only by the MMMSE, a number decreases when both tests are applied. This occurs because sequential implementation increases detection of mild cognitive

impairment and reduces false positives produced by low levels of education. Increased sensitivity has been described in validation studies and are appropriately utilised in population studies ^(15, 19).

Unlike other studies that observe higher rates of impairment in women, neither the MMMSE nor utilising both screening measures suggests the existence of a significant difference in cognitive decline by gender ^(26, 27). Moreover, the superior schooling of Chilean women as well as prolonged interactions with family members may stimulate cognitive function ^(28, 29). As in other studies, a lower risk of cognitive impairment is observed in subjects with higher levels of EDUL⁽³⁰⁻³²⁾, which may be explained by greater cognitive reserves from superior cortical and neuronal synaptic capacities or improved compensation for deficiencies arising from other brain regions ⁽³³⁻³⁴⁾.

Although the difference in SF level is statistically significant when comparing subjects with normal and impaired cognitive function (MMMSE plus PFAQ), in both cases these correspond to normal levels of SF, which reach supraphysiological levels ($>20 \mu\text{g/L}$) ⁽³⁵⁾ in the group with normal cognitive function. These higher levels may result from the universal folic acid fortification of wheat flour in Chile, high levels of consumption of farinaceous products ⁽³⁶⁾ or increased consumption of vitamin supplements among some older adults ^(13, 37).

Folate metabolism is closely linked to other vitamins, especially vitamin B₁₂. Both folate and B₁₂ function as cofactors dependent on methionine synthase enzyme. Severe and prolonged deficiency is associated with decreased synthesis of methionine and corresponding homocysteine increase. There is evidence that high levels of homocysteine induce damage in the central nervous system and influence cognitive impairment, dementia and Alzheimer's disease ⁽³⁸⁻⁴¹⁾. Different mechanisms have been postulated to explain cognitive impairment, including failure of glutathione metabolism and increased oxidative stress that leads to greater neuronal injury and hinders the reduction of vitamins to metabolically active forms ⁽⁴²⁾.

The multivariate analysis utilising only the MMMSE suggests that older adults with lower educational level, diabetes and hypertension exhibit a significant increase in the risk of ICF. As in other studies, diabetes and hypertension contribute to cognitive deterioration through atherosclerosis, microvascular disease and glucose toxicity ^{(30,}

³¹⁾Moreover, when cognitive impairment is evaluated using both diagnostic tests, older adults, males, diabetics, and those living in rural areas are at the greatest risk. These results are consistent with studies conducted in urban areas that observed greater cognitive function from superior life conditions and environmental stimuli ⁽³²⁾.

Deficits of folate are associated with failure of DNA methylation, which may increase the synthesis of beta-amyloid peptide, a determinant of Alzheimer's disease ⁽⁴³⁾. Low intake of folate and vitamin B₁₂ is associated with failure in the synthesis, transcription and integrity of DNA due to lower production of purines, especially thymidine. This would also produce lower DNA methylation, which is important not only in gene expression but also in epigenetic mechanisms that contribute to the demyelination and exchange of monoamines in depression ⁽²⁾.

Previous research describes the beneficial effects of folate supplementation under conditions of cognitive impairment ^(4, 7). Moreover, studies developed post-fortification of foods in the United States suggest a greater risk of high SF levels associated with a deficit in vitamin B₁₂ (<200 pg/ml); however, these results have not been described in countries in which fortification is not mandatory ⁽⁴⁴⁾. In this study, a significant increase in the risk of cognitive impairment is observed at low SF levels and at elevated levels. This risk varies according to the profile of each individual but it is higher among the elderly living in rural areas and those who have diabetes and hypertension, which suggests the importance of other variables when evaluating the impact of folic acid fortification.

Due to the important metabolic interactions between folate and vitamin B₁₂, this study evaluated the effects on cognitive function (MMSE plus PFAQ) of changing SF by one unit (1 µg/L) at different levels for both vitamins ⁽⁴⁵⁾. As in other studies, the existence of an increased risk of cognitive deterioration at low SF levels is observed; however, an unexpected finding is the increased risk associated with higher levels of vitamin B₁₂. This cross-sectional study suggests that the increased risk observed with low SF and high vitamin B₁₂ levels may be explained by high intakes of vitamin B₁₂, which may result from recommendations for older adults with cognitive impairment, increased fortified food consumption or vitamin supplements ⁽³⁷⁾. A limitation of this

study is the exclusive use of serum vitamin B₁₂ levels as to assess the nutritional status of this vitamin.

A significant increase in the likelihood of cognitive decline was also observed with increasing SF (1 µg/L) when the SF level is high and vitamin B₁₂ level is low. Studies conducted in the United States have described an increased risk of ICF at SF levels > 26 µg/L, which corresponds to approximately 80% unmetabolised folic acid^(46, 47). It is hypothesised that the increased risk of high SF levels is explained by the presence of free folic acid^(12, 46), which acts as an electron acceptor (oxidant) and results in the irreversible oxidation of intracellular vitamin B₁₂, which magnifies a deficiency. This pattern is similar to that observed upon exposure to nitric oxide, which results in the failure of the methionine synthetase enzyme. The reduced availability of vitamin B₁₂ as a cofactor for mitochondrial reactions magnifies the deficiency, the levels of homocysteine and methyl-malonic acid and their respective hematologic and neurologic consequences^(9, 47).

The high levels of SF observed in this study in elderly Chileans as well as the differences in the risk of impaired cognitive function depending on both SF and vitamin B₁₂ levels need to be evaluated in future studies and suggest the need to reassess the level of folic acid required in universal fortification to controlling excessive consumption that increases the risk of ICF in some older adult groups.

References

1. Smith PJ, Blumenthal JA. (2010) Diet and neurocognition: review of evidence and methodological considerations. *Curr Aging Sci* **3**, 57-66.
2. Reynolds EH. (2002) Folic acid. ageing. depression. and dementia. *BMJ* **324**, 1512-1515.
3. Morris MS. (2012) The role of B vitamins in preventing and treating cognitive impairment and decline. *Adv Nutr* **3**, 801-812.
4. Quadri P, Fragiaco C, Pezzati R et al. (2004) Zanda E. Forloni G. Tettamanti M. et al. Homocysteine. folate. and vitamin B₁₂ in mild cognitive impairment. Alzheimer disease and vascular dementia. *Am J Clin Nutr* **80**, 114-122.
5. Mischoulon D, Raab MF. The role of folate in depression and dementia. (2007) *J Clin Psychiatry* **68**, 28-33.
6. Morris MC, Evans DA, Bienias JL et al. (2005) Dietary folate and vitamin B₁₂ intake and cognitive decline among community-dwelling older persons. *Arch Neurol* **62**, 641-645.
7. Durga J, van Boxtel MP, Schouten EG et al. (2007) Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial. *Lancet* **369**, 208-216.
8. Rosenberg IH, Selhub J (2010) Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia. macrocytosis. and cognitive test performance in American seniors. *Am J Clin Nutr* **91**, 1733-44.
9. Selhub J, Morris MS, Jacques PF et al. (2009) Folate-vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment. anemia. and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. *Am J Clin Nutr* **89**, 702S-706S.
10. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH et al. (2007) Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia. macrocytosis. and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr* **85**, 193-200.
11. Morris MS, Selhub J, Jacques PF (2012) Vitamin B-12 and folate status in relation to decline in scores on the mini-mental state examination in the framingham heart study. *J Am Geriatr Soc* **60**, 1457-1464.
12. Sánchez H, Albala C, Hertrampf E et al (2010) Prevalence of vitamin B₁₂ deficiency in older adults. *Rev Med Chile* **138**, 44-52.

13. Castillo-Lancellotti C, Margozzini P, ValdiviaG *et al.* (2013) Nivel sérico de Folato y Vitamina B₁₂ en adultos mayores chilenos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud ENS 2009-10. *Rev Med Chile* **141**, 1107-1116.
14. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud (2010). *Encuesta Nacional de Salud ENS 2009-2010* www.redsalud.gov.cl (accessed December 2013).
15. Pontificia Universidad Católica de Chile. Políticas de Calidad de Laboratorios Clínicos. <http://redsalud.uc.cl/link.cgi/MS/Laboratorios/Somos/2626> (accessed September 2013).
16. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) Mini-Mental State: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* **12**, 189-198.
17. Chatfield M, Matthews F, Brayne C *et al.* (2007) Using the Mini-Mental State Examination for Tracking Cognition in the Older Population Based on Longitudinal Data. *J Am Geriatr Soc* **55**, 1066–1071.
18. Quiroga P, Albala C, Klaasen G (2004) Validation of a screening test for age associated cognitive impairment. in Chile. *Rev Med Chil* **132**, 467-478.
19. Icaza MG, Albala C (1999). *Minimental State Examination: Análisis estadístico del estudio de demencia en Chile para validar una versión abreviada. Investigaciones en Salud Pública: Documentos Técnicos*. Washington DC: OPS; available at <http://www.ssc.wisc.edu/sabe/codebookSABEsSpanish.pdf>.
20. Pfeffer RI, Kurosaki TT (1984) Chance JM *et al.* Use of the Mental Function Index in older adults: reliability. validity. and measurement of change over time. *Am J Epidemiol* **120**, 922-935.
21. Instituto Nacional de Estadísticas (1995). Chile Ciudades, Pueblos y Aldeas. <http://www.inevalparaiso.cl/archivos/files/pdf/ETNIAS/introduccion.pdf> (accessed December 2013).
22. Panamerican Health Organization (2006). Guías ALAD de diagnostic, control y tratamiento de Diabetes Mellitus tipo 2. <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/nc/dia-guia-alad.pdf#page=18&zoom=auto.0.644> (accessed August 2013).
23. Coleman A, Freeman P, Steel S *et al.* (2005) Validation of the Omron MX3 Plus oscillometric blood pressure monitoring device according to the European Society

- of Hypertension international protocol. *Blood Press Monit* **10**, 165-8.
24. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR *et al.* (2003) The National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7). *Hypertension* **42**, 1206-1252.
 25. Rosenberg IH (2008) Effects of folate and vitamin B12 on cognitive function in adults and the elderly. *Food Nutr Bull***29**, S132-42.
 26. Guerra RO, Alvarado BE, Zunzunegui MV Life course, gender and ethnic inequalities in functional disability in a Brazilian urban elderly population (2008) *Aging Clin Exp Res***20**, 53-61.
 27. Zunzunegui MV, Nunez O, Durban M *et al.* (2006) Decreasing prevalence of disability in activities of daily living, functional limitations and poor self-rated health: a 6-year follow-up study in Spain. *Aging Clin Exp Res***18**, 352-358.
 28. Helmer C (2009) Dementia and marital status at midlife and late life. *BMJ***339**,b1690.
 29. Ministerio de Planificación Chile (2011). Transformaciones en las estructuras familiares en Chile.
<http://www.ministeriodesarrollosocial.gob.cl/btca/txtcompleto/mideplan/transformac.fam.chilenas.pdf> (accessed August 2013).
 30. Rodríguez-Sánchez E, Mora-Simón S, Patino-Alonso MC *et al.* (2011) Prevalence of cognitive impairment in individuals aged over 65 in an urban area: DERIVA study. *BMC Neurol* **11**, 147.
 31. Gavrilá D, Antunez C, Tormo MJ *et al.* (2009) Prevalence of dementia and cognitive impairment in Southeastern Spain: the Ariadna study. *Acta Neurol Scand***120**, 300–307
 32. Moraes C, Pinto JA Jr, Lopes MA *et al.* (2010) Impact of sociodemographic and health variables on mini-mental state examination in a community-based sample of older people. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **260**, 535-42.
 33. Tucker AM, Stern Y (2011) Cognitive reserve in aging. *Curr Alzheimer Res* **8**, 354-360.
 34. Fernández-Ballesteros R, Botella J, Zamarrón MD *et al.* (2012) Cognitive plasticity in normal and pathological aging. *Clin Interv Aging* **7**, 15-25.

35. Dary O (2009) Nutritional interpretation of folic acid interventions. *Nutr Rev* **67**, 235-244.
36. Castillo C, Tur JA, Uauy R (2010) Flour fortification with folic acid in Chile. Unintended consequences. *Rev Med Chil* **138**, 832-40
37. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH *et al.* (2010) Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors. *Am J Clin Nutr* **91**, 1733-1744.
38. Feng L, Ng TP, Chuah L *et al.* (2006) Homocysteine, folate and vitamin B₁₂ and cognitive performance in older Chinese adults: findings from the Singapore Longitudinal Ageing Study. *Am J Clin Nutr* **84**, 1506-1512.
39. de Lau LM, Refsum H, Smith AD *et al.* (2007) Plasma folate concentration and cognitive performance: Rotterdam Scan Study. *Am J Clin Nutr* **86**, 728-34.
40. Ravaglia G, Forti P, Maioli F *et al.* (2005) Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* **82**, 636-643
41. McCaddon A, Regland B, Hudson P *et al.* (2002) Functional vitamin B(12) deficiency and Alzheimer disease. *Neurology* **14**, 1395-1399.
42. Ramos MI, Allen LH, Mungas DM *et al.* (2005) Low folate status is associated with impaired cognitive function and dementia in the Sacramento Area Latino Study on Aging. *Am J Clin Nutr* **82**, 1346-52
43. Irizarry MC, Gurol ME, Raju S *et al.* (2005) Association of homocysteine with plasma amyloid beta protein in aging and neurodegenerative disease. *Neurology* **65**, 1402-8.
44. Clarke R, Sherliker P, Hin H *et al.* (2008) Folate and vitamin B₁₂ status in relation to cognitive impairment and anaemia in the setting of voluntary fortification in the UK. *Br J Nutr* **100**, 1054-1059.
45. Green R (2011) Indicators for assessing folate and vitamin B-12 status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Am J Clin Nutr* **94**, 666S-72S.
46. Selhub J, Morris MS, Jacques PF *et al.* (2009) Folate-vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B-12 deficiency. *Am J Clin Nutr* **89**, 702S-706S
47. Boilson A, Staines A, Kelleher CC *et al.* (2012) Unmetabolized folic acid prevalence is widespread in the older Irish population despite the lack of a mandatory fortification program. *Am J Clin Nutr* **96**, 613-21.

Table 1. Table 1. General characteristics considering impaired cognitive function according to Modified Mini Mental Status Examination (MMMSE).

Characteristics	MMSE (Score)				P
	Normal	Altered	Mean	SE	
Age (years)	72·71	0·38	77·05	1·08	0·00015
Folate (ug/L)	21·36	0·61	19·98	1·35	0·354
Vit B12 (pg/ml)	341·19	7·9	386·11	20·52	0·041
	n	%	n	%	P
Gender					
Males	334	81·9	69	18·1	0·947
Females	528	82·2	111	17·8	
EDUL					
Basic	547	74·1	136	25·9	<0·0001
Medium	245	92·5	22	7·5	
Higher	55	96·7	3	3·3	
Area					
Urban	716	85·5	143	14·5	0·0077
Rural	146	67·3	37	32·7	
Diabetes					
No	567	86·1	91	13·9	0·153
Yes	171	77·5	46	22·5	
Hypertension					
No	206	91·8	24	8·2	0·003
Yes	556	80·5	129	19·5	

SE Standard Error

Table 2. General characteristics considering impaired cognitive function according to Modified Mini Mental Status Examination (MMMSE) plus Pfeffer Functional Activity Questionnaire (PFAQ).

Characteristics	MMSE + PFEFFER Test*				
	Normal		Altered		P
	Mean	ES	Mean	SE	
Age (years)	72.77	0.37	77.04	2.61	0.105
Folate (ug/L)	21.8	0.60	15.13	1.27	<0.0001
Vit B ₁₂ (pg/ml)	343.95	7.72	399.91	34.52	0.114
	n	%	n	%	P
Gender					
Males	355	90.4	26	9.6	0.058
Females	551	95.9	31	4.1	
EDUL					
Basic	587	89.8	47	10.2	0.002
Medium	249	97.7	9	2.3	
Higher	55	99.2	1	0.8	
Area					
Urban	753	95.2	46	4.8	0.073
Rural	153	86.3	11	13.7	
Diabetes					
No	591	95.3	33	4.7	0.3
Yes	194	89.9	11	10.1	
Hypertension					
No	212	96.9	6	3.1	0.107
Yes	586	92.2	43	7.8	

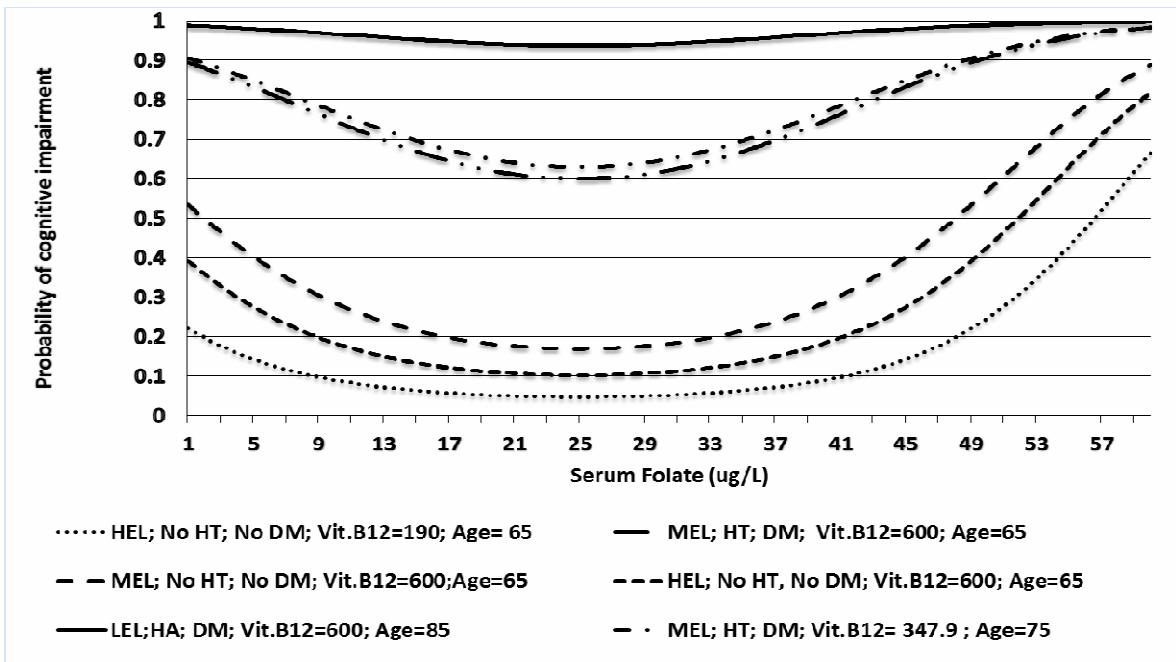
SE

Standard Error

Table 3. Multivariate analysis using logistic regression for impaired cognitive function according to Modified Mini Mental Status Examination (MMMSE) and Modified Mini Mental Examination plus Pfeffer Functional Activity Questionnaire (PFAQ).

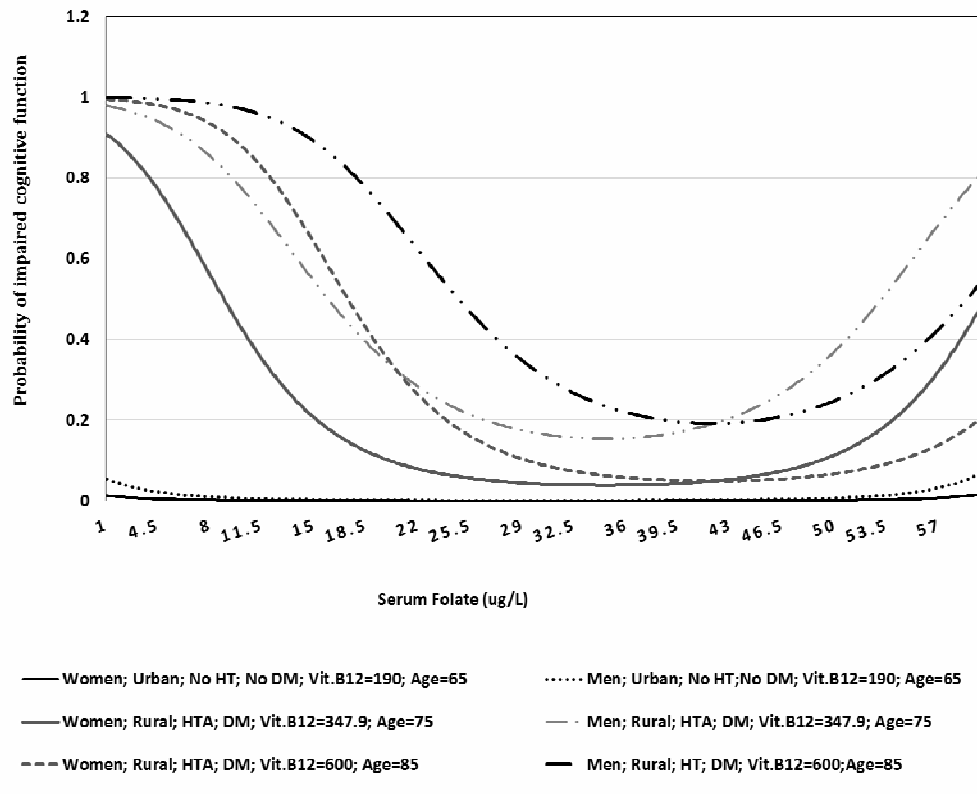
MMMSE						
Variables	β	S·E	P	OR	CI 95%	
					Lower	Upper
Intercept	-5·589	2·54	0·028			
EDUL (Basic)	1·610	0·739	0·030	5·002	1·172	21·353
EDUL (Medium)	0·575	0·804	0·475	1·777	0·367	8·608
Hypertension (Yes)	1·085	0·423	0·011	2·958	1·289	6·791
Age	0·063	0·027	0·022	1·065	1·009	1·123
Serum Folate	-0·150	0·067	0·026	*	*	*
Serum Folate²	0·003	0·001	0·039	*	*	*
Diabetes	0·914	0·422	0·031	2·493	1·088	5·713
Vitamin B₁₂	0·002	0·001	0·037	1·002	1·000	1·003
MMMSE + PFAQ						
Variables	β	S·E	P	OR	CI 95%	
					Lower	Upper
Intercept	-6·766	3·603	0·061			
Gender (Male)	1·524	0·5	0·002	4·592	1·721	12·256
Area (Urban)	-1·582	0·61	0·010	0·206	0·062	0·681
Diabetes (Yes)	1·233	0·592	0·038	3·432	1·074	10·968
Hypertension (Yes)	1·716	0·955	0·073	5·564	0·854	36·253
Age	0·086	0·04	0·032	1·537	1·038	2·275
Serum Folate	-0·241	0·097	0·014	*	*	*
Serum Folate²	0·005	0·002	0·005	*	*	*
Vitamin B₁₂	0·008	0·003	0·002	*	*	*
Serum Folate * B₁₂	0·00028	0·0001	0·049	*	*	*

* OR have been omitted since they depend on the values of at least one of the identified variables.



Hel, High educational level; MEL, Medium educational level; LEL, Low educational level; HT, Hypertension; No HT, no hypertension, DM, Diabetes Mellitus; No Diabetes Mellitus.

Figure 1. Probability of cognitive impairment (Modified Mini Mental Status Examination) according to serum folate for individuals with different profiles



HT, hypertension; No HT, No hypertension; DM, diabetes mellitus; No DM, No diabetes mellitus; Urban, urban residence; Rural, rural residence.

Figure 2. Probability of cognitive impairment (Modified Mini Mental Status Examination plus Pfeffer Functional Activity Questionnaire) according to serum folate for individuals with different profiles.

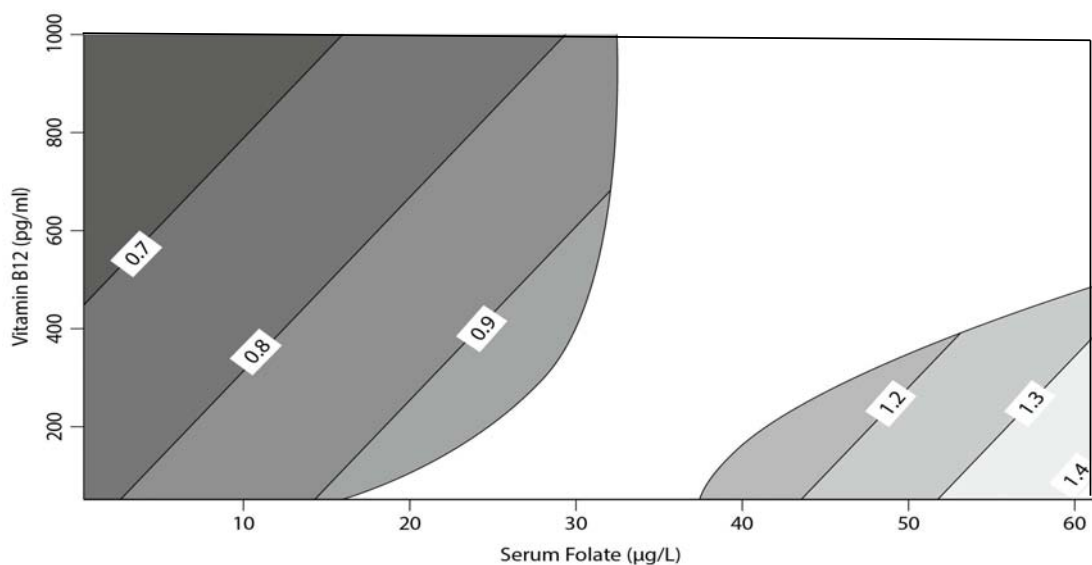


Figure 3. ORs variation on impaired cognitive function (Modified Mini Mental Status Examination plus Pfeffer Functional Activity Questionnaire) by increasing 1 µg/L of serum folate according to different combinations of serum folate and vitamin B₁₂ levels.

Comunicaciones a Congresos

20TH International Congress of Nutrition Granada Spain September 2013

Serum folate and vitamin B₁₂ in the elderly. Chilean National Health Survey 2009-10

Cecilia Castillo-Lancellotti, Paula Margozzini, Gonzalo Valdivia, Oslando Padilla, Ricardo Uauy, Jaime Rozowski, Josep A. Tur

Background and Objectives

Supraphysiological levels (SFL) of serum folate (SF) derived from flour fortification with folic acid (FA) may determine major health risks in older adults who present low levels of vitamin B₁₂ (B₁₂). The objective of this study is to describe and analyze SF and B₁₂ levels in elderly Chileans and to identify “at risk” groups

Aim: To describe and analyze SF and B₁₂ levels in elderly Chileans and to identify risk groups.

Material and Methods: Participants were 1.043 seniors (≥ 65 years old) from the National Health Chilean Health Survey 2009-2010 (ChNHS 2009-10), a multistage stratified random sample, representative of the national population. SF ($\mu\text{g/L}$) and B₁₂ (pg/ml) were determined in fasting samples (Competitive Chemoluminescence Immunoassay). Mean, deciles and percentiles 5 and 95th were calculated. We defined SF categories: < 4.4 (deficit); 4.41-20 (normal) and SFL: 20.01-25.6; 25.6-29 and > 29 $\mu\text{g/L}$ (80th percentile of the distribution) and vitamin B₁₂ categories: ≤ 200 (deficit); 200,1-299,5 (marginal deficit) and > 299.5 (normal). Prevalence rates, multiple and logistic regression models were used and adjusted by sex and age, educational level and residence area.

Results: SF and B₁₂ mean and 95th percentil were 21.2 (± 0.56)/38.6 $\mu\text{g/L}$ and 348.4 ($\pm 7,6$)/637 (pg/mL) respectively. 48,6% presented folate SFL; 0,3% and 8,1% presented folate and B₁₂ deficiency. Men had significantly lower prevalence of SFL $> 29 \mu\text{g/L}$ (OR adjusted 0.47 95% CI: 0.26-0,84). B₁₂ showed no significant variation by age and sex. Prevalence folate SFL associated with B₁₂ deficiency was 4,1%. No statistically significant association was observed between levels of folate and B₁₂.

Conclusions: For the first time, ChNHS 2009-10 enabled the evaluation of effects of folic acid fortification in older adults. Folate deficit is almost unexistent, but a

significant percentage ehad SFL suggesting the need for revising the current wheat flour fortification levels.

Keywords: folic acid, folate, vitamin B₁₂, elderly, fortification.

V. RECAPITULACIÓN

La importancia de los folatos radica en su participación en la metilación biológica y en la síntesis de los ácidos nucleicos necesarios para la formación, replicación y reparación del ADN (3); sin embargo, los folatos contenidos naturalmente en los alimentos difieren de la estructura química del ácido fólico, un folato sintético utilizado en la fortificación de alimentos y contenido en los suplementos alimentarios.

A diferencias de los folatos naturales, el ácido fólico se presenta en forma oxidada y contiene un solo residuo de glutamato conjugado, que favorece su absorción. Para entrar al ciclo del folato éste debe ser reducido primero a dihidrofolato y luego a tetrahidrofolato (351,352). Se ha observado que la enzima dihidrofolato-reductasa (DHFR) que cataliza ambas reacciones, pareciera tener una menor actividad en los seres humanos cuando se compara con otros animales. Esta actividad enzimática varía entre los individuos, lo que podría explicar su presencia en el plasma (353) y hace necesario controlar adecuadamente el nivel de ácido fólico utilizado en la fortificación universal de alimentos. Esto se justifica porque se ha observado que ingestas superiores a 200 µg/día generarían una saturación a nivel intestinal que se traduciría en la aparición en el plasma de ácido fólico sin metabolizar, especialmente cuando las dosis son repetidas y los consumos prolongados (354). Se ha descrito, además, que algunos de los efectos adversos en salud en relación a folatos estarían relacionados solo con el consumo de ácido fólico sintético y no con los folatos naturales (3, 351).

Considerando estos antecedentes, en esta Tesis Doctoral se ha desarrollado una revisión del efecto en salud de la suplementación con ácido fólico en algunos problemas de salud, así como también se ha investigado acerca de los beneficios y los riesgos en salud que podrían producirse en algunos grupos de población como resultado de la fortificación universal de harina de trigo con ácido fólico en Chile.

1. Revisiones Sistemáticas: beneficios y riesgos de folatos y ácido fólico

En países donde se ha implementado la fortificación universal de harina con ácido fólico se ha observado un aumento importante en los niveles de folato sérico y eritrocitario en toda la población, especialmente en las mujeres en edad fértil, el grupo poblacional objetivo de esta intervención (309-316). Estudios que evalúan la respuesta a ácido fólico han podido establecer la existencia de una función dosis respuesta entre el

nivel de folatos y el riesgo de tener un hijo con defectos de tubo neural (DTN), donde el mayor riesgo se observa en las mujeres con menores niveles de folato (355, 356).

La revisión sistemática que se desarrolló para conocer el impacto de la fortificación de harina de trigo con ácido fólico en base a estudios no controlados proveniente de diversos países muestra una importante reducción en la prevalencia de los defectos del tubo neural en todos aquellos que han implementado esta medida (357). Se observa que el resultado de esta intervención nutricional varía en los diferentes países como consecuencia de las diferencias existentes en la integridad y calidad de los sistemas de vigilancia. Se estima que el consumo de ácido fólico en forma de suplementos previo a la fortificación también podría limitar la evaluación de su impacto en la prevalencia de los defectos del tubo neural (358). Estas diferencias pueden responder, además, a las diferencias en los patrones de alimentación existente en los diferentes países.

Se observa que la disminución de los DTN no es uniforme y varía según región geográfica, características sociales y demográficas, siendo las más beneficiadas las mujeres pertenecientes a grupos con menores ingresos, mayor edad y sin cobertura social (359,360) . El mayor impacto se observa en aquellos países con las prevalencias más altas de defectos del tubo neural al momento de iniciar la fortificación (361-363). Los mejores resultados se encuentran en población hispánica por sobre la población negra, quienes muestran una menor prevalencia inicial y una menor reducción posterior a la intervención (357).

Desde el inicio de la fortificación con ácido fólico ha existido una fuerte polémica para definir cuales son los niveles adecuados de suplementación con ácido fólico. Estas diferencias pueden ser explicadas por la metodología de los estudios iniciales que fueron diseñados para determinar la respuesta del ácido fólico en los DTN, pero no para determinar cual era la menor dosis con la cual se lograba este beneficio (239). Mientras Daly et al. predice una declinación de 22, 41 y 47% en la prevalencia de DTN con incrementos en el consumo de 100, 200 y 400 μ g/día de ácido fólico (355), Wald et al. predice una declinación de 18%, 35, y 53% con ingestas equivalentes (356). Es importante tener presente que los estudios que utilizaron multivitamínicos no permiten establecer el efecto del ácido fólico en forma independiente, aspecto relevante considerando el rol recientemente descrito de la vitamina B₁₂ en la prevención de estas malformaciones (364) .

Si bien la relación entre folatos sanguíneos y prevención de DTN en su inicio es más bien proporcional que lineal, la respuesta a la ocurrencia de DTN con niveles más altos de ingesta de folatos no ha sido claramente establecida. A diferencia de lo descrito por Wald et al. que describió una relación linear (logarítmica) entre ingesta de ácido fólico, niveles de folato sanguíneo y reducción de los DTN, efectuando estimaciones más allá de los datos bases, es probable que se produzca más bien una estabilización, siguiendo un patrón de saturación al igual a lo observado en numerosos procesos metabólicos o bien una curva en U con aumento de prevalencia en el extremo superior (186). A partir de valores de folato sérico proveniente de diversos estudios (187,355,365), algunos autores han estimado que se podría obtener una adecuada prevención de los DTN con ingestas cercanas a 100 µg/día de ácido fólico, especialmente cuando se desarrolla una fortificación universal de alimentos en forma mandatoria. Esta adecuación en la recomendación de ácido fólico contribuiría a mantener los beneficios, limitando la exposición en otros grupos de población que no se benefician necesariamente con la fortificación con ácido fólico, pudiendo recomendarse una dosis superior solo para casos especiales, tales como, mujeres con antecedentes de hijos con DTN o polimorfismos de enzimas asociadas al metabolismo del folato (366).

Existe una extensa información publicada durante los últimos años en relación a riesgos en salud derivado de la suplementación con ácido fólico. Estos estudios desarrollados con diferentes modelos de investigación sugieren un aumento del riesgo de cáncer, especialmente cáncer de colon, cuando éste es consumido en altas dosis, por tiempo prolongado y asociado a la existencia de lesiones preneoplásicas previas (132). Estudios en animales de experimentación muestran que alteraciones genéticas, así como cambios nutricionales que influyen en el metabolismo del folato pueden tener distintas influencias en la génesis de tumores (126,127). Se describe que dietas tempranas deficientes en folato como ácido fólico reduce la tumorigénesis en ratas *Apc^{min/+}*, sin embargo, la suplementación produciría el efecto contrario. Se observa además, en ratas suplementadas durante el embarazo que reciben ácido fólico en cantidades equivalentes al que reciben las mujeres en la etapa de post-fortificación de harina en Estados Unidos, reducen la probabilidad (64%) de tener hijos con adenocarcinoma colorrectal. Sin embargo, en las crías de madres que recibieron dieta de control y suplementos de ácido

fólico posterior al destete, se observa un aumento significativo del número de tumores, así como también, de la metilación global de la mucosa colorrectal (367).

Al parecer, el desarrollo del cáncer colorrectal se produciría a partir del incremento en la proliferación celular de la mucosa colónica, seguida de la formación y crecimiento de un pólipo adenomatoso benigno que evoluciona con el tiempo hacia formas con altos grados de displasia. Considerando estos antecedentes se desarrolló una revisión sistemática de ensayos clínicos randomizados a doble ciego para conocer el efecto de la suplementación de ácido fólico en la prevención de la recurrencia de adenomas colorrectales (368). Cuando se analiza la ingesta de folatos dietarios y totales (dietarios más suplementados) en forma separada, se observa una disminución significativa del riesgo de cáncer colorrectal solo en relación a ingesta de folatos dietarios pero no cuando se suplementa ácido fólico (143, 369-371). Los resultados no permiten concluir que la suplementación de ácido fólico tenga un efecto beneficioso en la recurrencia de adenomas colorrectales (368). Considerando que se observa una gran heterogeneidad en los resultados, las futuras investigaciones debieran utilizar modelos con un poder estadístico suficiente que permita analizar los riesgos en diferentes subgrupos de población, así como también, poder evaluar el efecto de los diferentes tipos de folatos. Se debiera incorporar además, otras variables relacionadas con el cáncer de colon como son la presencia de polimorfismos de los genes correspondientes a las enzimas del ciclo del folato y el efecto del consumo de alcohol. La variación en relación a riesgo dependiendo del tipo de folatos, sugiere revisar los niveles de suplementación de ácido fólico, especialmente en algunos subgrupos que pudieran tener mayores riesgos para desarrollar adenomas y cáncer colorrectal (371, 372).

En relación a folatos y cáncer de mama, aún cuando el aumento en la ingesta de folatos pueda ser beneficioso para poblaciones con deficiencias, se ha observado que en mujeres con niveles adecuados de folatos podría no entregar beneficios adicionales, sino más bien constituir un riesgo. Los estudios desarrollados en animales de experimentación no muestran un beneficio adicional para prevención de tumores de mama cuando se aporta ácido fólico desde el inicio de la gestación, observándose, al igual que en el cáncer colorrectal, un efecto protector cuando existe deficiencia de

folato (373,374). Sin embargo, los resultados provenientes de estudios epidemiológicos no son consistentes con estos hallazgos en modelos animales.

Considerando la existencia en Chile de poblaciones con ingestas elevadas de ácido fólico (366), así como, con niveles elevados de folato sérico derivado de la fortificación de harina de trigo, se desarrolló una revisión sistemática para conocer los beneficios y riesgos en relación a folatos y cáncer de mama considerando diferentes modelos de estudios (375). La inclusión de variables que consideran diferentes tipos y niveles de folatos no permiten una adecuada comparación entre los estudios, limitando las conclusiones en relación a beneficios o riesgos de los folatos en relación a cáncer de mama (376,378). Los metaanálisis publicados en relación folatos y riesgo de cáncer de mama tampoco son concluyentes para identificar riesgos o beneficios dado la heterogeneidad de los estudios (379,380). Sólo se describe una asociación significativa para suplementación de ácido fólico y disminución de riesgo de cáncer de mama en mujeres con alto consumo de alcohol y bajo consumo de folatos. Cuando se considera algunos de los polimorfismos de la enzima MTHFR tampoco se observan asociaciones significativas. Sin embargo, cuando se estratifican por premenopausia y menopausia, la premenopausia aparece con un mayor riesgo para las mujeres homocigotas (C677 TT) (380-382). Otros autores describen que el efecto del folato varía según el tipo de tumor, por lo tanto, considerar el cáncer de mama como una sola entidad podría enmascarar la verdadera asociación existente entre folatos y los diferentes tipos de tumores, especialmente cuando en el análisis se incluyen receptores hormonales, sugiriendo que el riesgo de cáncer estaría mediado según el tipo de receptor (383, 384). Aún cuando algunos estudios desarrollados en la etapa de post-fortificación muestran un mayor riesgo asociado a altas ingestas, especialmente como ácido fólico (385), los resultados de la revisión sistemática efectuada no permiten concluir que exista beneficios o riesgos de la suplementación concordando con los resultados entregados por dos nuevos metaanálisis recientemente publicados que no describen una asociación en poblaciones suplementadas durante 5 años (148, 386).

El folato cumple importantes funciones en el crecimiento, diferenciación, desarrollo y reparación cerebral, así como también, en la cognición, el ánimo y el envejecimiento. Se considera que uno de los principales efectos adversos que podrían derivar de la fortificación universal con ácido fólico sería el enmascaramiento de la deficiencia de

vitamina B₁₂. Esta podría determinar una degeneración subaguda de la médula espinal si su diagnóstico no es oportuno. La anemia macrocítica es la base para el diagnóstico de deficiencia de vitamina B₁₂, siendo los signos neurológicos la última manifestación, aún cuando se describe que éstos pueden ser la primera manifestación del déficit (113).

El Límite Superior Tolerable de Ingesta (LSTI) para ácido fólico en adultos (1000 µg/día) fue definido considerando el nivel mas bajo observado para generar la progresión del daño neurológico en pacientes con déficit de vitamina B₁₂ cuando recibían dosis elevadas de ácido fólico (5 mg/día) (6). Además de este efecto, se ha descrito que el déficit de folato sérico se asociaría a una menor capacidad cognitiva como fallos en la memoria, disminución de la orientación, de la abstracción y de la capacidad para resolver problemas (110,186). Por otra parte, niveles elevados de folato sérico podría favorecer un mayor deterioro de la función cognitiva, específicamente asociado a bajos niveles de vitamina B₁₂ (116).

Considerando que la fortificación de harina de trigo con ácido fólico ha determinado un importante aumento en el nivel de folato sérico de los adultos mayores chilenos (349), se desarrolló una revisión sistemática con el fin de identificar los beneficios y riesgos en relación a ingesta de folatos y deterioro cognitivo del adulto mayor (387). Se observa que existe una gran variación de los resultados en los diferentes estudios considerados en la revisión. En algunos, la suplementación mejora la función cognitiva cuando los niveles de folato sérico iniciales son bajos (110-112,388-392). Por otra parte, estudios desarrollados en población norteamericana posterior a la fortificación universal, que analizan folato sérico y función cognitiva, muestran una mayor velocidad de deterioro cuando éstos presentan niveles elevados de folato sérico asociados a niveles deficitarios de vitamina B₁₂ (116, 190, 350). De los estudios de cohorte revisados, sólo uno, desarrollado en Estados Unidos, muestra una asociación semejante (402). Sin embargo, esta relación no se observa en estudios transversales desarrollados en otros países. Por otra parte, la revisión de estudios clínicos randomizados que suplementan ácido fólico no muestran beneficio o riesgo para deterioro de la función cognitiva (393-398). Al igual que lo descrito en otras revisiones sistemáticas y metaanálisis (399, 400), la revisión efectuada no permite concluir que la suplementación de ácido fólico tenga un efecto positivo en la función cognitiva de los adultos mayores pero sugiere la necesidad

de evaluar la función cognitiva en países con fortificación universal y poblaciones con altos niveles de folato sérico.

2. Fortificación de harina de trigo con ácido fólico en Chile

2.1 Nivel de ácido fólico en harina de trigo

Las políticas de fortificación de alimentos desarrolladas por diferentes países han demostrado ser altamente costo-efectivas (253). A nivel mundial, existe un número importante de países que han optado por implementar esta intervención nutricional o bien proveer a su población sólo de harina fortificada, sin embargo, solo algunos de ellos monitorean el contenido final de ácido fólico en harina y los efectos en salud (297).

La fortificación de harina de trigo con ácido fólico en Chile se inicia de manera universal el año 2000 (2.2 mg/kg) con el objetivo de prevenir los defectos del tubo neural en el recién nacido aportando 400 µg/día a la embarazada a través del consumo de pan y productos derivados (281). Solo cuatro años después iniciada la fortificación, se implementa un laboratorio que permitió determinar el contenido de ácido fólico presente en la harina de trigo y el establecimiento de un sistema de monitoreo. Por lo tanto, no existe información del contenido de ácido fólico en la harina durante los primeros años de la fortificación limitando las adecuaciones o modificaciones del programa y la identificación de eventuales riesgos para la salud.

La información recolectada entre los años 2005 y 2012 muestra la existencia de una gran variabilidad en el contenido de ácido fólico en la harina. Entre los años 2005 y 2008 destaca que 50% de las muestras presenta un nivel de ácido fólico inferior a lo establecido según la norma chilena, 10% de las muestras no contienen ácido fólico y 30% presenta niveles muy elevados.

Tabla 7. Distribución del Contenido de Acido Fólico* en Harina de Trigo (mg/kg), Chile 2005 – 2012

Año	n	P10	P20	P30	P40	P50	P60	P70	P80	P90	P95	P97
2005	338	0.0	0.59	1.21	1.51	1.9	2.2	2.5	3.0	4.3	5.9	7.4
2006	391	0.2	0.65	1.01	1.36	1.61	1.99	2.4	3.06	5.03	9.8	15.9
2007	279	0.1	0.58	0.99	1.27	1.51	1.77	2.3	2.8	4.8	8.6	10.1
2008	243	0.0	0.9	0.3	0.68	1.1	1.5	1.8	2.0	2.6	3.2	3.74
2009	287	0.0	0.67	1.02	1.26	1.58	1.92	2.27	2.78	3.68	5.4	7.7
2010	176	0.95	1.37	1.76	2.025	2.26	2.61	3.15	4.07	4.07	4.53	5.46
2011	212	1.04	1.34	1.69	1.96	2.41	2.81	3.3	4.9	4.9	6.27	7.0
2012	208	0.88	1.31	1.63	1.83	2.23	2.67	2.87	4.86	4.86	7	7.23

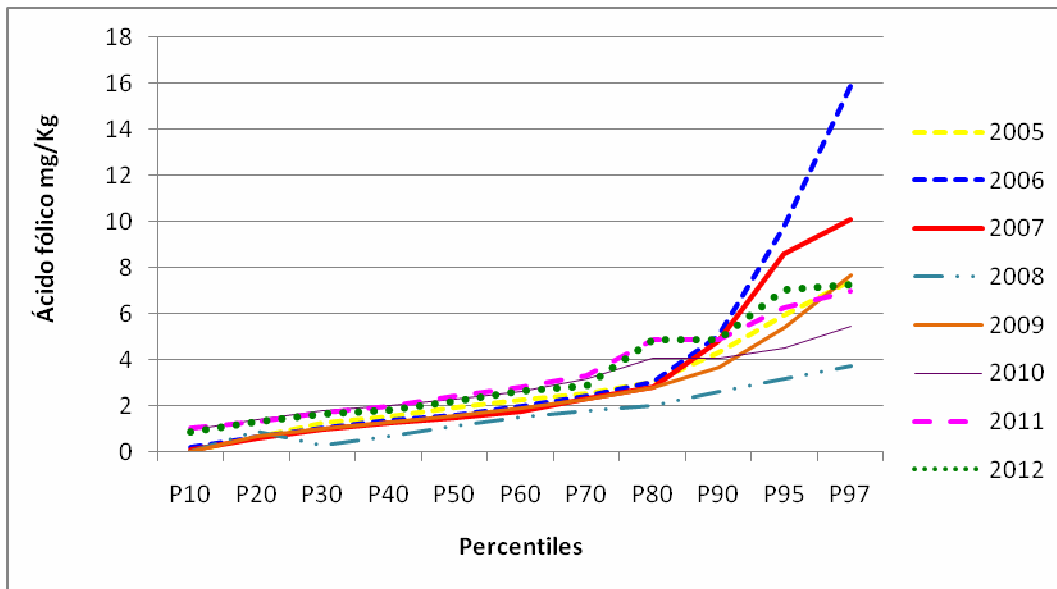
*P=percentiles

A partir del año 2010 y en concordancia con la fijación de un nuevo nivel para ácido fólico en harinas (1.8 mg/kg), se observa un cambio en el contenido de ácido fólico en relación a los años anteriores donde no se observan muestras sin ácido fólico, sin embargo, la mediana de contenido sobrepasa ampliamente lo establecido en la norma chilena, alcanzando en el percentil 80 niveles superiores a lo observado los años anteriores (Figura 5).

Figura 5. Distribución del Contenido de Acido Fólico* en Harina de Trigo (mg/kg).

Años

2005-2012



*P=percentiles

Estas diferencias en el contenido de ácido fólico en la harina de trigo podrían ser explicadas por problemas de tipo fabril, como por ejemplo, granulometría inadecuada de la premezcla de vitaminas, falta de homogeneización de la premezcla de vitaminas, uso inadecuado del mezclador, o bien, un mezclado insuficiente. Estos podrían corresponder también, a una sobredosificación voluntaria de los industriales que les permita asegurar el cumplimiento de la norma. Estas dificultades relacionadas con el aseguramiento de calidad fabril son factores que pueden determinar que el objetivo de la fortificación no se cumpla en Chile en forma adecuada.

2.2 Nivel de folato sérico en población chilena

Algunos de los países que fortifican con ácido fólico en forma universal, como por ejemplo, Estados Unidos y Canadá han establecido un monitoreo de indicadores bioquímicos de folato a través de estudios o encuestas nacionales que permiten observar y analizar la tendencia del folato sérico y eritrocitario entre otros indicadores, en diferentes grupos de población (185,401,402). Chile no cuenta con un sistema de

vigilancia de estas características. Para conocer el resultado de la fortificación en el nivel de folato sérico de la población, se desarrolló una revisión sistemática de la información científica disponible en Chile. Debe destacarse que el número de publicaciones sobre este tema en el país es limitado, encontrándose información sólo en relación a folatos en mujeres en edad fértil y adultos mayores.

Los datos disponibles en mujeres en edad fértil previa a la fortificación de alimentos muestran que éstas presentaban un bajo nivel de folato sérico (4.3 µg/L) y eritrocitario (128 µg/L), que respaldaban la determinación de fortificar con ácido fólico. La evaluación de estas mismas mujeres, un año después de iniciada la fortificación, muestra un incremento promedio en los niveles de folato (16.4 µg/L) y eritrocitario (312 µg/L), lográndose de esta forma una mejoría en la situación nutricional del folato en mujeres de edad fértil (9).

En adultos mayores, el primer estudio disponible para revisión aporta información de folato sérico durante el año 1998, dos años previos a la fortificación de la harina de trigo. Los resultados muestran que la población estudiada, adultos mayores de bajo nivel socioeconómico de la Región Metropolitana de Santiago, presentaban un bajo nivel de folato sérico tanto en hombres como en mujeres (3.08 y 3.97 µg/L) (403). Estudios desarrollados con posterioridad, durante la etapa de fortificación, muestran un importante incremento de estos niveles. Si bien las poblaciones de los diferentes estudios de esta revisión sistemática no son comparables, los resultados permiten observar una tendencia creciente en los niveles de folato sérico en adultos mayores (334,349,404).

El incremento en los niveles de folato sérico se ha observado también en otros países que fortifican harina de trigo, tales como Estados Unidos y Canadá (1.5 mg/kg) donde, igual que en Chile, se observa que el déficit de folatos es casi inexistente en la población (405-407).

Estudios desarrollados en Estados Unidos post-fortificación describen la existencia de poblaciones con niveles suprafisiológicos de folato sérico (>20 µg/L), especialmente en adultos mayores (354,360-362). Los datos de folato sérico entregados por la Encuesta Nacional de Salud del año 2009-2010 en adultos mayores chilenos muestran un incremento del folato sérico post-fortificación, observándose que alrededor del 50% de

los ancianos presenta niveles considerados suprafisiológicos ($>20 \mu\text{g/L}$) (186,333). Estudios desarrollados en Estados Unidos describen que los niveles elevados de folato sérico se observan especialmente en población que consume suplementos vitamínicos (408).

2.3 Estimación indirecta de la ingesta de folatos en Chile

En Chile, el 100% de la harina de trigo se encuentra fortificada; es decir, además del pan, todos los alimentos en base a harina de tipo industrial (409). Este corresponde a un alimento de consumo masivo, presente en forma diaria en la dieta de todos los chilenos. Se estima que el consumo *per capita* promedio bordea los 98 kg/año, donde el 53% del pan consumido corresponde a sectores de menores ingresos. En el otro extremo se ubican los consumidores de nivel socioeconómico medio-alto y alto que representan 5% del total de consumo sugiriendo que el mayor consumo corresponde a poblaciones con menores ingresos (410).

Chile no cuenta con encuestas nacionales ni regionales de alimentación que permitan estimar el consumo de folatos dietarios totales en toda la población. Para conocer que ha representado la fortificación de harina de trigo en el consumo de ácido fólico, se desarrollaron algunas estimaciones indirectas considerando el consumo aparente de pan según diferentes niveles de ácido fólico en harina. De acuerdo a estas estimaciones entre los años 2005 a 2007, un consumo de 2 a 3 panes diarios que se hubieran elaborado con harinas con un contenido de ácido fólico correspondiente al observado en el P95 de la distribución habría tenido ingestas de ácido fólico mayor al Límite Superior Tolerable de Ingesta para ácido fólico establecido para adultos ($1000 \mu\text{g/día}$) (410).

Tomando como base una encuesta de consumo dirigida a un segmento específico de la población, niños entre 8 y 13 años, especialmente de nivel socioeconómico bajo, la ingesta de ácido fólico habría alcanzado a un nivel cercano al Límite Superior Tolerable de Ingesta para ese grupo etario ($600 \mu\text{g/día}$) (6). Si se considera que el pan es solo uno de los alimentos en base a harina de trigo que contiene ácido fólico, la ingesta total sería mayor a esta estimación (365,410). La inexistencia de datos de consumo que refleje la exposición de ácido fólico durante todo el período de fortificación impide conocer desde el punto de vista dietario cual ha sido la ingesta real de este nutriente, producto de

la fortificación universal, en la población en general.

También se desarrolló una estimación indirecta de la ingesta de folato total utilizando la propuesta de Quinlivan et al. (337,338). Estos investigadores desarrollaron una fórmula que permite estimar el incremento del consumo de folatos a partir de la variación de folato sérico. Para ello incorporaron al modelo siete estudios que medían la concentración de folato sérico o plasmático en poblaciones pre y postfortificación después de al menos 6 semanas de la intervención. A través del desarrollo de una regresión logística establecieron una ecuación que describe la relación entre folatos séricos y consumo de folatos (337). Esta ecuación fue posteriormente ajustada para estimar la ingesta como Equivalentes Dietarios de Folato (EDF) (338). Cuando aplicamos esta fórmula al nivel de folato sérico proveniente de diferentes estudios chilenos, podemos estimar que la ingesta adicional de ácido fólico alcanzaría en algunos grupos de adultos mayores ingestas de alrededor 2000 $\mu\text{g}/\text{día}$ de EDF. Esto representa una ingesta de ácido fólico superior al Límite Superior de Ingesta Tolerable (1000 $\mu\text{g}/\text{día}$) (6). Sin embargo, el uso de esta fórmula tiene algunas limitaciones debido a que la estimación de folato dietario en los niveles más elevados de folato sérico puede ser aproximada, dado que en la construcción de la fórmula se consideraron diferentes fuentes de información, así como también, existen imprecisiones en los datos basales que determinan que el incremento de folato sérico dibujaría una línea recta, cuando se esperaría, al igual que en otros procesos biológicos, que un exceso de ingesta pudiera semejar más bien una curva de saturación que de incremento indefinido (186,365).

La falta de una encuesta nacional de alimentación en Chile es una limitación para evaluar el consumo general de folatos, así como también de ácido fólico, especialmente en grupos de población distintos a las mujeres en edad fértil, quienes no fueron definidos inicialmente como el grupo objetivo de esta intervención, impidiendo caracterizar en forma adecuada los beneficios y los riesgos asociados.

3. Beneficios y Riesgos de la Fortificación con ácido fólico en Chile

3.1 Prevalencia de los defectos del tubo neural

Un año después del iniciada la fortificación de harina de trigo con ácido fólico en Chile

(2001), se observa una reducción de 42% en la prevalencia de DTN. La disminución en alcanza a 55% en el período analizado (1999-2009), observándose la prevalencia más baja siete años después de iniciada la fortificación (7.03/10000 recién nacidos), que representa una reducción de 60% cuando se compara con el número de DTN que ocurrían el año previo a la fortificación (1999). Entre los años 2008 y 2009 observa un incremento, cercano al 20%, en relación a la prevalencia más baja del período analizado (2007) (357).

La inexistencia en Chile de un sistema de monitoreo de malformaciones congénitas después del año 2009 impide el análisis de la tendencia en la prevalencia de los DTN posterior a este período. Cuando se analiza la prevalencia considerando el nivel de ácido fólico contenido en harina de trigo (mediana), se observa que la prevalencia es más elevada cuando la harina de trigo presenta los niveles más bajos de ácido fólico (mediana = 1.1 mg/kg). La menor prevalencia se observa cuando la mediana del contenido de ácido fólico en harinas alcanza a 1.5 mg/kg sugiriendo que es necesario controlar los niveles de ácido fólico en harina en forma adecuada para optimizar los beneficios de esta intervención nutricional (357).

3.2 Deterioro de la función cognitiva en adultos mayores chilenos

Considerando la interrelación metabólica existente entre folato y vitamina B₁₂ y su importancia en la función cognitiva, se analizó la información disponible en relación a deterioro de función cognitiva y el nivel sérico de ambas vitaminas en adultos mayores chilenos. Además de lo descrito anteriormente, en relación a la alta prevalencia (50%) de adultos mayores con niveles suprafisiológicos (>20 µg/L) se observa que el déficit de folatos en la población estudiada es casi inexistente (0.3%), similar a lo descrito en otros países que fortifican con ácido fólico (411).

Si bien en Chile no existe fortificación obligatoria de alimentos con vitamina B₁₂, se puede observar que su déficit es menor (8.1%) al observado en la etapa de pre-fortificación (≈50%) (278) considerando para su definición el mismo punto de corte (<200 pg/ml) (349,404). Estos mayores niveles podrían derivar de una mejoría en el acceso a alimentos de mayor valor biológico, así como también, al consumo de alimentos fortificados. Una limitación en el diagnóstico de la situación nutricional de la

vitamina B₁₂ es el uso exclusivo del nivel sérico de esta vitamina. Es probable que incorporando otros indicadores más sensibles para la identificación del déficit de vitamina B₁₂, tales como determinación de ácido metil-malónico y holotranscobalamina se pudiera mejorar el diagnóstico de la deficiencia de esta vitamina (189).

En el análisis efectuado destaca que 13.7% de los hombres y 25.2% de las mujeres presentan niveles de folato sérico particularmente elevados (>29 µg/L), siendo éstos significativamente más altos en mujeres después de ajustar por edad, educación y lugar de residencia. Es probable que estos niveles pudieran estar presentes en subgrupos de población con un mayor consumo de alimentos elaborados con harina de trigo, pero también asociado a consumo de multivitamínicos (34). El análisis adicional de la base de datos de medicamentos de la ENS 2009-10 muestra que 4.7% y 3.2% de los adultos mayores estudiados consumen suplementos vitamínicos conteniendo ácido fólico y vitamina B₁₂, siendo su consumo significativamente mayor en aquellos con niveles de folato sérico >20 µg/L. Por otra parte, del total que no usan suplementos, 49.5% tienen niveles de folatos considerados suprafisiológico (411).

A diferencia de lo observado en otras investigaciones (117,350), en este estudio no se observa diferencias significativas en los niveles de vitamina B₁₂ considerando diferentes categorías de folatos. Del total de adultos mayores estudiado, 4.1% (55367 adultos mayores) presentan niveles suprafisiológicos de folato sérico asociado a déficit de vitamina B₁₂ (<200 pg/ml) y 48% de los que presentan un déficit marginal (200-299.5 pg/ml) (411).

Se observa, además, que los adultos mayores con deterioro cognitivo evaluados utilizando Mini Examen de Estado Mental Modificado (MMMSE) presentan significativamente mayor edad y niveles de vitamina B₁₂, en relación a los sujetos normales. No se observa una diferencia significativa en el nivel de folato sérico. Aquellos con nivel educacional (NEDU) bajo presentan mayor prevalencia de deterioro cognitivo (25.9%) que aquellos con NEDU medio y alto (7.5 y 3.3% respectivamente). Los que viven en zona rural muestran una mayor prevalencia de deterioro en relación a los de zonas urbanas (32.7 versus 14.5%). Por otra parte, la prevalencia de deterioro cognitivo es mayor entre los individuos hipertensos (19.5%).

Cuando se compara los resultados obtenidos aplicando en forma secuencial ambas pruebas de evaluación cognitiva (MMMSE más CAPF) y se comparan con los obtenidos al aplicar MMMSE, se observa que la diferencia según edad y nivel sérico de vitamina B₁₂ no es significativa. Aquellos individuos con función cognitiva alterada (MMMSE más CAPF) presentan niveles de folato sérico significativamente inferiores, aún cuando en ambos grupos el promedio de folato sérico corresponde a valores normales. También existe una mayor prevalencia de deterioro cognitivo en los sujetos con NEDU bajo (10.2 % versus 2.3% en el nivel medio y 0.8% en el nivel alto) siendo mayor, aunque no significativo, en la zona rural cuando se compara con la zona urbana. Esto podría ser explicado en el nivel educacional superior por la existencia de una mayor reserva cognitiva derivada de una mejor y mayor capacidad sináptica cortical y neuronal, así como también, de una mejor compensación de las deficiencias derivadas del funcionamiento de otras regiones cerebrales (411-413).

Las diferencias en la función cognitiva en cuanto a sexo son más marcadas cuando se utiliza ambas pruebas de evaluación cognitiva que cuando se usa solo MMMSE, sin que éstas diferencias lleguen a ser estadísticamente significativas. Esto difiere de lo observado en otros estudios que muestran un mayor deterioro en mujeres (414) y que podría ser explicado por una mejor escolaridad en mujeres chilenas, así como, por una mayor y prolongada interacción con otros miembros de la familia que actuaría como un estímulo para la función cognitiva (415-417).

Al utilizar ambas pruebas de evaluación cognitiva no se observa una diferencia significativa en relación a deterioro cognitivo considerando diabetes y la diferencia que se encuentra en individuos hipertensos al evaluar por MMMSE se pierde, aún cuando se ha descrito que la diabetes y la hipertensión arterial serían factores determinantes del deterioro derivado de la aterosclerosis, la enfermedad microvascular y la toxicidad de la glucosa (417-419).

En el primer modelo de análisis multivariado, al dibujar la dependencia de las probabilidades de presentar daño cognitivo utilizando MMMSE en relación a FS, se observa individuos con diferentes perfiles de riesgo, con una curva de riesgo tipo U que muestra una disminución de éste en la medida que aumenta el nivel de FS (hasta 25 µg/L). A partir de este nivel se observa un incremento del riesgo que no alcanza a ser

significativo. Al dibujar diferentes perfiles de individuos incluyendo las otras variables de control, se observa que el perfil de menor riesgo corresponde a un sujeto de 65 años, con educación superior, sin hipertensión arterial ni diabetes y con valores de vitamina B₁₂ normal. El de mayor riesgo corresponde a un sujeto de 85 años, con NEDU básica, diabético e hipertenso y con un nivel sérico de B₁₂ de 600 pg/ml. Cuando se considera ambas pruebas diagnósticas (MMSE más CAFP) se observa una curva de riesgo semejante donde el mayor riesgo corresponde al perfil de un sujeto hombre, de 85 años, que vive en zona rural, hipertenso, diabético y con un nivel sérico de vitamina B₁₂ elevado de 600 pg/ml. Las menores probabilidades de deterioro de la función cognitiva corresponde a una mujer de 65 años, de zona urbana, sin hipertensión arterial, sin diabetes y con un nivel de vitamina B₁₂ bajo, de 190 pg/ml. La existencia de individuos con diferentes perfiles de riesgo sugieren la necesidad de incorporar en el análisis otras variables cuando se evalúa el impacto de la fortificación con ácido fólico.

Finalmente, se muestra la variación en el riesgo de deterioro cognitivo (utilizando MMSE más CAFP) que se produce cuando el nivel de folato sérico aumenta en una unidad (1 µg/L) para diferentes combinaciones de FS y vitamina B₁₂. Los diferentes colores representan un nivel de OR diferente. Así, en la esquina superior izquierda (color rojo), correspondiente a valores de folato sérico muy bajos y de vitamina B₁₂ elevados, se observa que el aumento en una unidad de folato sérico (1 µg/L) disminuye el riesgo en alrededor del 40% (OR aproximado de 0.6). Por el contrario, los valores de la esquina inferior derecha (color violeta), con valores de folato sérico muy elevado y vitamina B₁₂ bajos, muestran que el incremento en una unidad de folato sérico produce un aumento del riesgo (OR aproximado 1.4). La región central en blanco corresponde a valores de folato sérico y vitamina B₁₂ para los cuales el cambio en una unidad (µg/L) de FS no se traduce en un cambio de riesgo significativo.

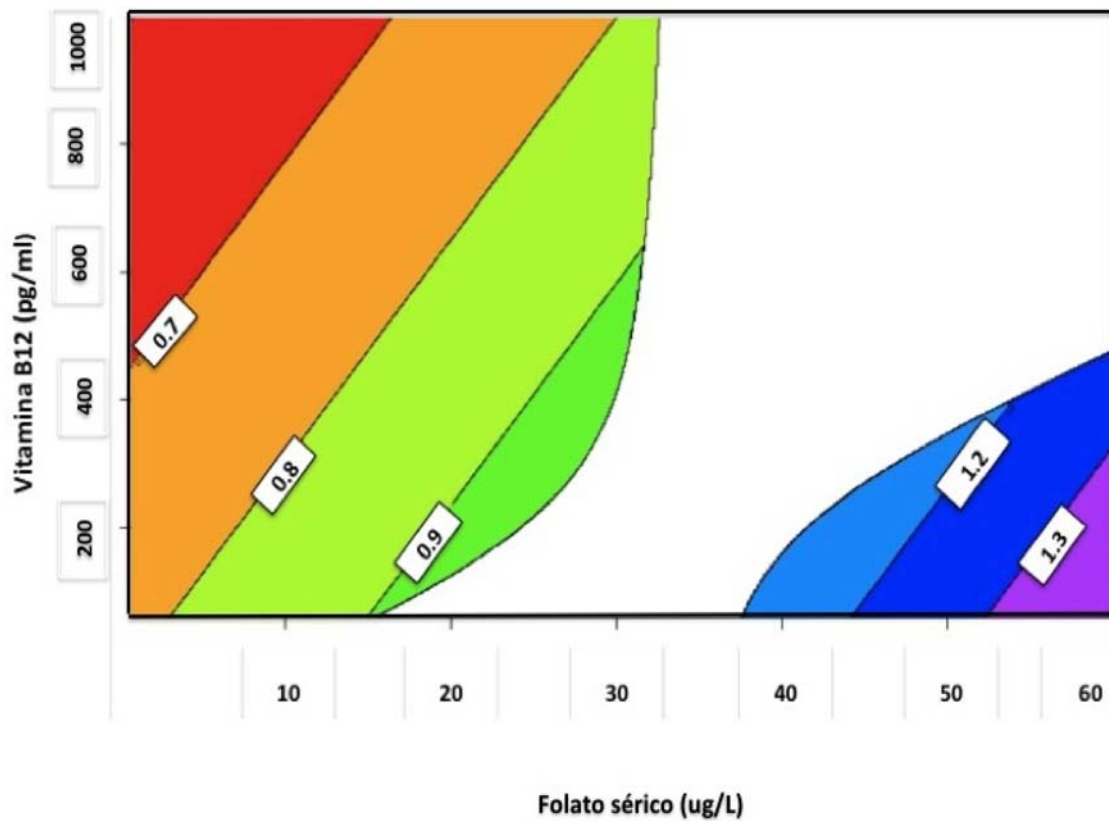


Figura 6. OR para deterioro de la función cognitiva por cada unidad de cambio de folato sérico ($\mu\text{g/L}$) considerando diferentes niveles de folato sérico y vitamina B₁₂

Un hallazgo no esperado es el mayor riesgo que se observa cuando el nivel de folato sérico disminuye y el de vitamina B₁₂ aumenta. Considerando que este análisis proviene de un estudio transversal, el mayor riesgo de deterioro cognitivo que aparece en relación al aumento de la vitamina B₁₂ podría ser interpretado como resultado de una causalidad reversa, producida por una mayor ingesta de vitamina B₁₂, especialmente recomendada a adultos mayores con deterioro cognitivo o a un mayor consumo de alimentos fortificados o de suplementos vitamínicos (411).

Estos resultados concuerdan con estudios desarrollados durante la post-fortificación de alimentos en Estados Unidos que describen un mayor riesgo de deterioro de la función cognitiva cuando los niveles de FS son elevados asociados a un déficit de vitamina B₁₂ (<200 pg/ml) (190,393,350). Sin embargo, este mayor riesgo no ha sido descrito en países donde no existe fortificación obligatoria de alimentos con ácido fólico (420).

Los resultados presentados en relación a nivel de folato sérico, vitamina B₁₂ y deterioro de la función cognitiva en adultos mayores chilenos hacen necesario evaluar la existencia de riesgos en salud en otros grupos de población y revisar los niveles de ácido fólico establecidos para fortificación de harina en Chile, de modo tal que se mantengan los beneficios logrados en la prevención de defectos del tubo neural en los recién nacidos, pero que prevenga el incremento de riesgo para deterioro de la función cognitiva en adultos mayores observado en ambos extremos de la distribución de folato sérico.

VI. CONCLUSIONES

1. La revisión sistemática desarrollada en relación a fortificación universal de harina de trigo demuestra el beneficio de esta medida en la prevención de los defectos del tubo neural del recién nacido en todos los países donde ésta se ha desarrollado.
2. La información proveniente de algunos modelos de estudios, especialmente en modelos de experimentación animal, sugieren que la suplementación con ácido fólico podría determinar un mayor riesgo en algunos tipos de cáncer, entre ellos, cáncer de colon, cuando la suplementación se realiza en altas dosis, por tiempo prolongado y cuando existen lesiones preneoplásicas.
3. La revisión sistemática desarrollada en relación a suplementación de ácido fólico y recurrencia de adenomas colorrectales no demuestra beneficio de la suplementación con ácido fólico. En algunos estudios se describe que la suplementación contribuye a la prevención de cáncer colorrectal en etapas anteriores al desarrollo de una neoplasia y cuando existe déficit de folato sérico.
4. La revisión sistemática desarrollada para conocer el efecto de la suplementación de ácido fólico en cáncer de mama no muestra un efecto beneficioso en la prevención de este tipo de cáncer. Algunos estudios sugieren una diferencia en el riesgo dependiendo del tipo de folatos consumidos, del tipo de receptores hormonales en la mama y del consumo de alcohol.
5. La revisión sistemática en relación a folatos y deterioro de la función cognitiva en adultos mayores muestra un beneficio de la suplementación en individuos con bajos niveles de folato sérico; observándose, además, un aumento del riesgo en individuos con niveles suprafisiológicos de folato cuando se asocia a niveles deficientes de vitamina B₁₂.
6. Los niveles de ácido fólico que determinarían una mayor probabilidad de riesgo en salud no aparecen claramente establecidos en los estudios revisados.
7. En Chile se observa una importante variación del contenido de ácido fólico en la harina de trigo durante todo el período analizado (2005-2012). Los elevados niveles encontrados en un porcentaje importante de las muestras de harina sugiere la necesidad de establecer mejores controles de calidad fabril con el objetivo de mejorar el impacto en salud de esta intervención nutricional, así como también limitar los riesgos en salud derivados de un aporte excesivo.

8. La falta de encuestas que estudien los patrones de consumo de la población chilena limita la caracterización adecuada de los beneficios y riesgos del consumo de ácido fólico, ya sea por exceso, pero también por déficit.
9. La estimación indirecta del consumo de folatos dietarios en Chile en embarazadas y adultos mayores muestra un incremento en el consumo de folatos totales post-fortificación, observándose en algunos grupos de ancianos ingestas de folatos totales cercanas al Límite Superior Tolerable de Ingesta.
10. Se concluye que la fortificación universal de harina de trigo con ácido fólico en Chile ha sido una intervención nutricional exitosa que ha determinado una importante reducción (55%) de la prevalencia de los defectos del tubo neural durante el período analizado en este estudio (1999-2009), que determina un beneficio para la salud y calidad de vida de los recién nacidos.
11. La fortificación de harina de Chile ha determinado un importante incremento del nivel de folato sérico en adultos mayores y la inexistencia de déficit de folato sérico. La presencia de alrededor de 50% de los adultos mayores estudiados con niveles de folato sérico supra fisiológicos hacen necesario reevaluar el aporte esta vitamina en este grupo de población, con el objetivo de controlar el exceso.
12. Se observa una diferencia en el riesgo para deterioro cognitivo en adultos mayores chilenos dependiendo del nivel de folato sérico semejando una curva en U. Este riesgo varía al incorporar otras variables de control, determinando la existencia de individuos con diferentes perfiles de riesgo.
13. Cuando se evalúa la función cognitiva con la aplicación de dos pruebas (MMSE más CAF) en forma secuencial se observa que la probabilidad de riesgo de deterioro cognitivo del adulto mayor en Chile varía según el nivel de folato sérico y vitamina B₁₂. Ésta disminuye en forma significativa con cada unidad de incremento folato sérico (1 µg/L), mientras más bajo sea el nivel de folato sérico y más elevado el de vitamina B₁₂ y aumenta significativamente cuando el incremento de folato sérico cuando los niveles de folato sérico son muy elevados y los niveles de vitamina B₁₂ son bajos.
14. El análisis global de la fortificación universal de harina de trigo con ácido fólico en Chile sugiere la necesidad de revisar esta intervención con un enfoque de riesgo,

considerando que algunas poblaciones estarían recibiendo un aporte excesivo de ácido fólico.

15. La decisión de fortificar alimentos con ácido fólico en forma universal debiera considerar desde sus inicios un sistema de evaluación que permitiera monitorear el nivel de ácido fólico en los alimentos fortificados, así como los indicadores bioquímicos relacionados .
16. La probabilidad de un mayor riesgo en el deterioro de la función cognitiva de los adultos mayores asociado a niveles de folato sérico elevados sugiere revisar el nivel establecido para fortificar la harina de trigo con ácido fólico en Chile, de modo tal que permita mantener los beneficios logrados en la prevención de defectos del tubo neural en el recién nacido, pero que prevenga el incremento de riesgo en ambos extremos de la distribución de folato sérico.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Wills L. Treatment of pernicious anaemia of pregnancy and tropical anaemia with special reference to yeast extract as curative agent. *Br Med J* 1931;1:1059-64.
2. Hoffbrand AV, Weir DG. The history of folic acid. *Br J Haematol.* 2001;113(3):579-89.
3. Kim YI. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. *Mol Nutr Food Res.* 2007;51(3):267-92.
4. Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab.* 2000;71(1-2):121-38.
5. Alonso E, Varela G. (2010). Ácido fólico y vitamina B₁₂. En Gil A (Ed.) *Tratado de Nutrición. Tomo I. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. 2ª Edición Madrid 2010 (pp 527-532).*
6. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary reference intakes: thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B₆, folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline. A Report of the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins and Choline and Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients. Washington, DC: National Academy Press, 1998
7. Camilo E, Zimmerman J, Mason JB, Golner B, Russell R, Selhub J, Rosenberg IH. Folate synthesized by bacteria in the human upper small intestine is assimilated by the host. *Gastroenterology.* 1996;110(4):991-98.
8. Asrar FM, O'Connor DL. Bacterially synthesized folate and supplemental folic acid are absorbed across the large intestine of piglets. *J Nutr Biochem.* 2005;16(10):587-93.
9. Cooperman JM, Lopez R. The role of histidine in the anemia of folate deficiency. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002;227(11):998-1000.
10. Fox JT, Stover PJ. Folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitam Horm.* 2008;79:1-44.
11. Herbig K, Chiang EP, Lee LR, Hills J, Shane B, Stover PJ. Cytoplasmic serine

- hydroxymethyltransferase mediates competition between folate-dependent deoxyribonucleotide and S-adenosylmethionine biosyntheses. *J Biol Chem.* 2002;277:38381–89.
12. Suh JR, Herbig AK, Stover PJ. New perspectives on folate catabolism. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:255-82.
 13. Green JM, MacKenzie RE, Matthews RG. Substrate flux through methylenetetrahydrofolate dehydrogenase: predicted effects of the concentration of methylenetetrahydrofolate on its partitioning into pathways leading to nucleotide biosynthesis or methionine regeneration. *Biochemistry.* 1988;27(21):8014-22.
 14. Bertolo RF, McBreaity LE. The nutritional burden of methylation reactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013;16(1):102-8.
 15. Shane B. Folate and vitamin B12 metabolism: overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphisms. *Food Nutr Bull.* 2008;29(2 Suppl):S5-S16
 16. Stabler SP. Clinical practice. Vitamin B₁₂ deficiency. *N Engl J Med.* 2013;368(2):149-60.
 17. Dorweiler JS, Finke RG, Matthews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase: probing the role of the axial base in catalysis of methyl transfer between methyltetrahydrofolate and exogenous cob(I)alamin or cob(I)inamide. *Biochemistry.* 2003;42(49):14653-62.
 18. Drennan CL, Matthews RG, Ludwig ML. Cobalamin-dependent methionine synthase: the structure of a methylcobalamin-binding fragment and implications for other B₁₂-dependent enzymes. *Curr Opin Struct Biol.* 1994;4(6):919-29.
 19. Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(12):1694-99.
 20. Finkelstein JD. Inborn errors of sulphur-containing amino acid metabolism. *J Nutr* 2006; 136(S6):1750S-54S.

21. Olivar Roldán J, Fernández Martínez A, Díaz Guardiola P, Martínez Sancho E, Díaz Gómez J, Gómez Candela C. Clinical management of homocystinuria: case report and review of the literature. *Nutr Hosp.* 2012;27(6):2133-38.
22. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr.* 1998;157(Suppl 2):S40-S44.
23. Anguera MC, Field MS, Perry C, Ghandour H, Chiang EP, Selhub J et al. Regulation of folate-mediated one-carbon metabolism by 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 2006 ;281(27):18335-42.
24. Gregory JF 3rd, Cuskelly GJ, Shane B, Toth JP, Baumgartner TG, Stacpoole PW. Primed, constant infusion with [2H3]serine allows in vivo kinetic measurement of serine turnover, homocysteine remethylation, and transsulfuration processes in human one-carbon metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(6):1535-41.
25. Tibbetts AS, Appling DR. Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2010;30:57-81.
26. Appling DR. Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. *FASEB J.* 1991;5(12):2645-51.
27. Christensen KE, MacKenzie RE. Mitochondrial one-carbon metabolism is adapted to the specific needs of yeast, plants and mammals. *Bioessays.* 2006;28(6):595-605.
28. Anderson DD, Woeller CF, Stover PJ. Small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) modification of thymidylate synthase and dihydrofolate reductase. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(12):1760-63.
29. Bissoon-Haqqani S, Moyana T, Jonker D, Maroun JA, Birnboim HC. Nuclear expression of thymidylate synthase in colorectal cancer cell lines and clinical samples. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(1):19-29.
30. Hamid A, Wani NA, Kaur J. New perspectives on folate transport in relation to alcoholism-induced folate malabsorption--association with epigenome stability and cancer development. *FEBS J.* 2009;276(8):2175-91.

31. Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med.* 2009;28:11-14.
32. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell.* 2006;127(5):917-28.
33. Matherly LH, Goldman DI. Membrane transport of folates. *Vitam Horm.* 2003; 66:403-56.
34. Boilson A, Staines A, Kelleher CC, Daly L, Shirley I, Shrivastava A, Bailey SW, Alverson PB, Ayling JE, McDermott AP, MacCooey A, Scott JM, Sweeney MR. Unmetabolized folic acid prevalence is widespread in the older Irish population despite the lack of a mandatory fortification program. *Am J Clin Nutr.* 2012;96(3):613-21.
35. Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 2003;22(47):7537-552.
36. Stover PJ, Field MS. Trafficking of intracellular folates. *Adv Nutr.* 2011;2(4):325-31
37. Birn H, Spiegelstein O, Christensen EI, Finnell RH. Renal Tubular Reabsorption of Folate Mediated by Folate Binding Protein 1. *JASN* 2005;16:608-15.
38. Wright AJ, Dainty JR, Finglas PM. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. *Br J Nutr.* 2007;98(4):667-75.
39. Wu D, Pardridge WM. Blood-brain barrier transport of reduced folic acid. *Pharm Res.* 1999;16(3):415-19.
40. Geller J, Kronn D, Jayabose S, Sandoval C. Hereditary folate malabsorption: family report and review of the literature. *Medicine* 2002;81:51-68

41. Nakazato M, Maeda T, Emura K, Maeda M, Tamura T. Blood folate concentrations analyzed by microbiological assay and chemiluminescent immunoassay methods. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2012;58(1):59-62.
42. Huangfu Z, Wang Y, Zheng J. [Lactobacillus casei microbiological assay of plasma and RBC concentrations of folic acid with 96-well microtiter plates]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2003;32(1):56.
43. Gutiérrez JI, Pérez Hernández F, Castrillo Rubio, Romero JG, Bocos P. Distribución de la concentración sérica de folato, folato eritrocitario y cobalamina *Química Clínica* 2003;22(6):403-408
44. Hutson JR, Stade B, Lehotay DC, Collier CP, Kapur BM. Folic acid transport to the human fetus is decreased in pregnancies with chronic alcohol exposure. *PLoS One*. 2012;7(5):e38057.
45. Wallace JM, Bonham MP, Strain J, Duffy EM, Robson PJ, et al. Homocysteine concentration, related B vitamins, and betaine in pregnant women recruited to the Seychelles Child Development Study. *Am J Clin Nutr* 2008;87:391–97.
46. Solanky N, Requena Jimenez A, D'Souza SW, Sibley CP, Glazier JD. Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism. *Placenta* 2010;31:134–43.
47. 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.
48. Anguera MC, Suh JR, Ghandour H, Nasrallah IM, Selhub J, Stover PJ. Methenyltetrahydrofolate synthetase regulates folate turnover and accumulation. *J Biol Chem*. 2003;278(32):29856-862.
49. Mönch S, Netzel M, Netzel G, Rychlik M. Quantitation of folates and their catabolites in blood plasma, erythrocytes, and urine by stable isotope dilution assays. *Anal Biochem*. 2010;398(2):150-60.

50. Caudill MA, Gregory JF, Hutson AD, Bailey LB. Folate catabolism in pregnant and nonpregnant women with controlled folate intakes. *J Nutr.* 1998;128(2):204-208.
51. Gregory JF 3rd, Williamson J, Liao JF, Bailey LB, Toth JP. Kinetic model of folate metabolism in nonpregnant women consuming [2H₂]folic acid: isotopic labeling of urinary folate and the catabolite para-acetamidobenzoylglutamate indicates slow, intake-dependent, turnover of folate pools. *J Nutr.* 1998;128(11):1896-1906
52. Gregory JF 3rd, Quinlivan EP. In vivo kinetics of folate metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:199-220.
53. Lin Y, Dueker SR, Follett JR, Fadel JG, Arjomand A, Schneider PD, Miller JW, Green R, Buchholz BA, Vogel JS, Phair RD, Clifford AJ. Quantitation of in vivo human folate metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(3):680-91.
54. Büttner BE, Öhrvik VE, Witthöft CM, Rychlik M. Quantification of isotope-labelled and unlabelled folates in plasma, ileostomy and food samples. *Anal Bioanal Chem.* 2011;399(1):429-39.
55. Bassett MN, Sammán NC. Folate content and retention in selected raw and processed foods. *Arch Latinoam Nutr.* 2010;60(3):298-305.
56. Shohag MJ, Wei YY, Yu N, Zhang J, Wang K, Patring J, He ZL, Yang XE. Natural variation of folate content and composition in spinach (*Spinacia oleracea*) germplasm. *J Agric Food Chem.* 2011; 59(23):12520-26.
57. Gregory JF, 3rd. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Adv Food Nutr Res.* 1989;33:1-101.
58. AACC International. *Approved Methods of Analysis*, 11 th ed. Method 86-47.01. total folate in cereal products- Microbiological Assay using trienzyme extraction; AACC International: St. Paul, MN, USA, 2000. Disponible en <http://methods.aaccnet.org/summaries/86-47-01.aspx> [Consultado 3 de abril de 2013].
59. LešKová E, Kubiková J, kováciková E, Košická M, Porubská J, Holciková K.

- Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis* 2005;19:252-76.
60. Blake CJ. Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review. *Anal Bioanal Chem.* 2007;389(1):63-76.
 61. Vahteristo LT, Ollilainen V, Varo P. Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg, and dairy products consumed in Finland. *J AOAC Int.* 1997;80(2):373-378.62. Olivares A, Ros Berruezo G, Bernal MJ, Martínez C, Periago Castón MJ. Estimación de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico en alimentos. *ALAN* 2005; 55(1):5-14.
 63. Pitkin RM. Folate and neural tube defects. *Am J Clin Nutr.* 2007;85(1):285S-88S.
 64. Hibbard ED, Smithells RW. Folic acid metabolism and human embryopathy. *Lancet.* 1965;i:1254.
 65. Hibbard BM, Hibbard ED. Folate deficiency in pregnancy. *Br Med J.* 1968;4(5628):452-53.
 66. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, Seller MJ, Nevin NC, Harris R, Read AP, Fielding DW. Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Arch Dis Child.* 1981;56(12):911-18.
 67. Laurence KM, James N, Miller MH et al. Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. 1981; *Br Med J* 282: 1509-11.
 68. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991;8760:131-37.
 69. Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *JAMA* 1993;269:1257-61.

70. Shaw GM, Schaffer D, Velie EM et al. Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology* 1995;6:219-26.
71. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamins supplementation. *N Engl J Med* 1992;327(26):1832-35.
72. Hernández-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 2000;343:1608-14.
73. Public Health Service of the United States. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of Spina bifida and other neural tube defects. *MMWR Morb Mortal Wkl Rep* 1992;41:1-7.
74. Lawrence MA, Chai W, Kara R, Rosenberg IH, Scott J, Tedstone A. FDA. Examination of selected national policies towards mandatory folic acid fortification. *Nutr Rev* 2009;67(Suppl 1):S73-S78
75. Hesecker HB, Mason JB, Selhub J, Rosenberg IH, Jacques PF. Not all cases of neural-tube defect can be prevented by increasing the intake of folic acid. *Br J Nutr* 2008;16:1-8.
76. Copp AJ, Greene NDE, Murdoch JN. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet* 2003;4:784-93
77. Hook EB, Czeizel AE. Can terathanasia explain the protective effect of folic-acid supplementation on birth defects? *Lancet* 1997;350:513-15.
78. Marean A, Graf A, Zhang Y, Niswander L. Folic acid supplementation can adversely affect murine neural tube closure and embryonic survival. *Hum Mol Genet.* 2011; 20(18):3678-83.
79. Leck I. Causation of neural tube defects: clues from epidemiology. *Br Med Bull* 1974; 30: 158-63.
80. Amorim MR, Lima MA, Castilla EE, Orioli IM. Non-Latin European descent could be a requirement for association of NTDs and MTHFR variant 677C > T: a meta-analysis. *Am J Med Genet A* 2007;143A:1726-32.
81. Parle-McDermott A, Pangilinan F, O'Brien KK, et al. A common variant in

- MTHFD1L is associated with neural tube defects and mRNA splicing efficiency. *Hum Mutat* 2009;30:1650–56.
82. Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, et al. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. *Hum Mol Genet* 2012;21:1496–1503.
83. Dunlevy LPE, Chitty LS, Doudney K, et al. Abnormal folate metabolism in foetuses affected by neural tube defects. *Brain* 2007;130:1043–49.
84. Pike ST, Rajendra R, Artzt K, Appling DR. Mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase (MTHFD1L) supports the flow of mitochondrial one-carbon units into the methyl cycle in embryos. *J Biol Chem* 2010;285:4612–20.
85. Wallingford JB, Niswander LA, Shaw GM, Finnell RH. The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects. *Science*. 2013;339(6123):1222002.
86. Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet*. 2010;11(5):331-44.
87. Murdoch JN, Copp AJ. The relationship between sonic Hedgehog signaling, cilia, and neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010;88(8):633-52.
88. Oh EC, Katsanis N. Cilia in vertebrate development and disease. *Development*. 2012;139(3):443-48.
89. Vogel TW, Carter CS, Abode-Iyamah K, Zhang Q, Robinson S. The role of primary cilia in the pathophysiology of neural tube defects. *Neurosurg Focus*. 2012;33(4):E2.
90. Gao B, Song H, Bishop K, et al. Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. *Dev Cell* 2001; 20:163-76.
91. Juriloff DM, Harris MJ. A consideration of the evidence that genetic defects in planar cell polarity contribute to the etiology of human neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012;94(10):824-40.

92. Allache R, De Marco P, Merello E, Capra V, Kibar Z. Role of the planar cell polarity gene CELSR1 in neural tube defects and caudal agenesis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012; 94(3):176-81.
93. Greene ND, Stanier P, Moore GE. The emerging role of epigenetic mechanisms in the aetiology of neural tube defects. *Epigenetics* 2011;6:875–83.
94. Genton P, Semah F, Trinkka E. Valproic acid in epilepsy : pregnancy-related issues. *Drug Saf.* 2006;29(1):1-21.
95. Copp AJ, Stanier P, Greene ND. Neural tube defects: recent advances, unsolved questions, and controversies. *Lancet Neurol.* 2013;12(8):799-10.
96. Allen LH. Causes of vitamin B₁₂ and folate deficiency. *Food Nutr Bull.* 2008; 29(2 Suppl):S20-S34.
97. McNulty H, Scott JM. Intake and status of folate and related B-vitamins: considerations and challenges in achieving optimal status. *Br J Nutr.* 2008;99 Suppl 3:S48-54.
98. Fenech M. Folate (vitamin B₉) and vitamin B₁₂ and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. *Mutat Res.* 2012; 733(1-2):21-33.
99. Reynolds EH. Folic acid, ageing, depression, and dementia. *BMJ* 2002;324:1512–15.
100. Reynolds E. Vitamin B₁₂, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol.* 2006; 5(11):949-60. 100. Reynolds E. Vitamin B₁₂, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol* 2006;5(11):949-60.
101. Savage DG, Lindenbaum J. Neurological complications of acquired cobalamin deficiency: clinical aspects *Bailliere's Clin Haematol* 1996;8:657–78.
102. D'Anci KE, Rosenberg IH. Folate and brain function in the elderly. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004;7(6):659-64.
103. Quadri P, Fragiaco C, Pezzati R, Zanda E, Forloni G, Tettamanti M, Lucca U. Homocysteine, folate, and vitamin B-12 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and vascular dementia. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(1):114-22.

104. McCaddon A, Regland B, Hudson P, Davies G. Functional vitamin B(12) deficiency and Alzheimer disease. *Neurology*. 2002;58(9):1395-99.
105. Mischoulon D, Raab MF. The role of folate in depression and dementia. *J Clin Psychiatry*. 2007;68(Suppl 10):28-33.
106. Irizarry MC, Gurol ME, Raju S, Diaz-Arrastia R, Locascio JJ, Tennis M et al. Association of homocysteine with plasma amyloid beta protein in aging and neurodegenerative disease. *Neurology*. 2005;65(9):1402-08.
107. Selhub J. Public health significance of elevated homocysteine. *Food Nutr Bull*. 2008;29(2 Suppl):S11621-25
108. Young SN. Folate and depression--a neglected problem. *J Psychiatry Neurosci*. 2007;32(2):80-82.
109. Iskandar BJ, Nelson A, Resnick D, Skene JH, Gao P, Johnson C et al. Folic acid supplementation enhances repair of the adult central nervous system. *Ann Neurol*. 2004;56(2):221-27.
110. Feng L, Ng TP, Chuah L, Niti M, Kua EH. Homocysteine, folate, and vitamin B-12 and cognitive performance in older Chinese adults: findings from the Singapore Longitudinal Ageing Study. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(6):1506-12
111. de Lau LM, Refsum H, Smith AD, Johnston C, Breteler MM. Plasma folate concentration and cognitive performance: Rotterdam Scan Study. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(3):728-34.
112. Ramos MI, Allen LH, Mungas DM, Jagust WJ, Haan MN, Green R et al. Low folate status is associated with impaired cognitive function and dementia in the Sacramento Area Latino Study on Aging. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82(6):1346-52.
113. Weir DG, Scott JM. Brain function in the elderly: role of vitamin B12 and folate *Br Med Bull* 1999;55(3):669-82
114. Hathout L, El-Saden S. Nitrous oxide-induced B12 deficiency myelopathy: Perspectives on the clinical biochemistry of vitamin B12. *J Neurol Sci* 2011;301(1-2):1-8.

115. Selhub J, Morris MS, Jacques PF. In vitamin B₁₂ deficiency, higher serum folate is associated with increased total homocysteine and methylmalonic acid concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(50):19995-20000.
116. Selhub J, Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH. Folate-vitamin B₁₂ interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B₁₂ deficiency). Folate-vitamin B-12 interaction in relation to cognitive impairment, anemia, and biochemical indicators of vitamin B₁₂ deficiency. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(2):702S-6S.
117. Ly A, Hoyt L, Crowell J, Kim YI. Folate and DNA methylation. *Antioxid Redox Signal.* 2012;17(2):302-26.
118. Vinson C, Chatterjee R. CG methylation. *Epigenomics.* 2012;4(6):655-63.
119. Stover PJ. Physiology of folate and vitamin B₁₂ in health and disease. *Nutr Rev.* 2004; 62(6 Pt 2):S3-S12
120. Gu J, Spitz MR, Zhao H, Lin J, Grossman HB, Dinney CP, Wu X. Roles of tumor suppressor and telomere maintenance genes in cancer and aging--an epidemiological study. *Carcinogenesis.* 2005; 26(10):1741-47.
121. Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1997;18(5):869-82.
122. Cole BF, Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Ahnen DJ, Bresalier RS et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2007;297(21):2351-59.
123. Lashner BA, Heidenreich PA, Su GL, Kane SV, Hanauer SB. Effect of folate supplementation on the incidence of dysplasia and cancer in chronic ulcerative colitis. A case-control study. *Gastroenterology* 1989;97(2):255-59.
124. Carrier J, Medline A, Sohn KJ, Choi M, Martin R, Hwang SW et al. Effects of dietary folate on ulcerative colitis-associated colorectal carcinogenesis in the interleukin 2- and beta(2)-microglobulin-deficient mice. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(11 Pt 1):1262-67.

125. Song J, Sohn KJ, Medline A, Ash C, Gallinger S, Kim YI. Chemopreventive effects of dietary folate on intestinal polyps in Apc^{+/-}Msh2^{-/-} mice. *Cancer Res.* 2000;60(12):3191-99.
126. Lawrance AK, Deng L, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and low dietary folate reduce tumorigenesis in Apc min/+ mice. *Gut.* 2009;58(6):805-11.
127. Lindzon GM, Medline A, Sohn KJ, Depeint F, Croxford R, Kim YI. Effect of folic acid supplementation on the progression of colorectal aberrant crypt foci. *Carcinogenesis.* 2009;30(9):1536-43.
128. Bailey LB, Rampersaud GC, Kauwell GP. Folic acid supplements and fortification affect the risk for neural tube defects, vascular disease and cancer: evolving science. *J Nutr.* 2003;133(6):1961S-68S.
129. Giovannucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: A review. *J Nutr.* 2002;132:2350S-55S.
130. Terry P, Jain M, Miller AB, Howe GR, Rohan TE. Dietary intake of folic acid and colorectal cancer risk in a cohort of women. *Int. J. Cancer* 2002;97:864 – 67.
131. Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. A prospective study of dietary folate intake and risk of colorectal cancer: modification by caffeine intake and cigarette smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(3):740-43.
132. Van Guelpen B, Hultdin J, Johansson I, Hallmans G, Stenling R, Riboli E et al. Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut.* 2006;55(10):1461-66.
133. Kim YI, Fawaz K, Knox T, Lee YM, Norton R, Libby E et al. Colonic mucosal concentrations of folate are accurately predicted by blood measurements of folate status among individuals ingesting physiologic quantities of folate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(6):715-19.
134. Choi SW, Friso S, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Edmondson AN, Smith DE et al. Biochemical and molecular aberrations in the rat colon due to folate depletion are age-specific. *J Nutr* 2003;133(4):1206-12.

135. Kim YI, Fawaz K, Knox T, Lee YM, Norton R, Arora S et al. Colonic mucosal concentrations of folate correlate well with blood measurements of folate status in persons with colorectal polyps. *Am J Clin Nutr* 1998;68(4):866-72.
136. McGlynn AP, Wasson GR, O'Reilly SL, McNulty H, Downes CS, Chang CK, et al. Low colonocyte folate is associated with uracil misincorporation and global DNA hypomethylation in human colorectum. *J Nutr*. 2013;143(1):27-33.
137. Kim YI. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and pharmacogenetics: a new role of single nucleotide polymorphisms in the folate metabolic pathway in human health and disease. *Nutr Rev*. 2005;63(11):398-407.
138. Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2004;159(5):423-43.
139. Brockton NT. Localized depletion: the key to colorectal cancer risk mediated by MTHFR genotype and folate? *Cancer Causes Control*. 2006;17(8):1005-16.
140. Ulrich CM. Folate and cancer prevention--where to next? Counterpoint. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(9):2226-30.
141. Choi S, W Mason JB. Folate status: Effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr*. 2002;132; 2413S–18S.
142. Sawan C, Vaissière T, Murr R, Herceg Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res*. 2008;642(1-2):1-13.
143. Sanjoaquin MA, Allen N, Couto E, Roddam AW, Key TJ. Folate intake and colorectal cancer risk: A meta-analytical approach. *Int J Cancer* 2005;113;825–28.
144. Kennedy DA, Stern SJ, Moretti M, Matok I, Sarkar M, Nickel C et al. Folate intake and the risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol*. 2011;35(1):2-10.

145. Kim DH, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, Colditz GA, Freudenheim JL et al. Pooled analyses of 13 prospective cohort studies on folate intake and colon cancer. *Cancer Causes Control*. 2010;21(11):1919-30.
146. Chuang SC, Rota M, Gunter MJ, Zeleniuch-Jacquotte A, Eussen SJ, Vollset SE et al. Quantifying the Dose-Response Relationship Between Circulating Folate Concentrations and Colorectal Cancer in Cohort Studies: A Meta-Analysis Based on a Flexible Meta-Regression Model. *Am J Epidemiol*. 2013;178(7):1028-37.
147. Kennedy DA, Stern SJ, Matok I, Moretti ME, Sarkar M, Adams-Webber T, Koren G. Folate Intake, MTHFR Polymorphisms, and the Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Cancer Epidemiol*. 2012;2012:952508.
148. Vollset SE, Clarke R, Lewington S, Ebbing M, Halsey J, Lonn E et al. Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: meta-analyses of data on 50,000 individuals. *Lancet*. 2013;381(9871):1029-36.
149. Figueiredo JC, Mott LA, Giovannucci E, Wu K, Cole B, Grainge MJ et al. Folic acid and prevention of colorectal adenomas: a combined analysis of randomized clinical trials. *Int J Cancer*. 2011;129(1):192-03.
150. Ibrahim EM, Zekri JM. Folic acid supplementation for the prevention of recurrence of colorectal adenomas: metaanalysis of interventional trials. *Med Oncol*. 2010;27(3):915-18.
151. Qin X, Cui Y, Shen L, Sun N, Zhang Y, Li J et al. Folic acid supplementation and cancer risk: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cancer*. 2013;133(5):1033-41.
152. Fife J, Raniga S, Hider PN, Frizelle FA. Folic acid supplementation and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2011;13(2):132-7
153. Lin HL, An QZ, Wang QZ, Liu CX. Folate intake and pancreatic cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis. *Public Health*. 2013;127(7):607-13.

154. Dai WM, Yang B, Chu XY, Wang YQ, Zhao M, Chen L, Zhang GQ. Association between folate intake, serum folate levels and the risk of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(10):1957-64
155. Collin SM, Metcalfe C, Refsum H, Lewis SJ, Zuccolo L, Smith GD et al. Circulating folate, vitamin B12, homocysteine, vitamin B₁₂ transport proteins, and risk of prostate cancer: a case-control study, systematic review, and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(6):1632-42.
156. Collin SM. Folate and B12 in prostate cancer. *Adv Clin Chem*. 2013;60:1-63.
157. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985;37:1–31.
158. Wilcken DE, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976;57:1079–82.
159. Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(12):2466-71
160. Jamaluddin MD, Chen I, Yang F, Jiang X, Jan M, Liu X, Schafer AI, Durante W, Yang X, Wang H. Homocysteine inhibits endothelial cell growth via DNA hypomethylation of the cyclin A gene. *Blood*. 2007;110(10):36483655.
161. Stühlinger MC, Stanger O. Asymmetric dimethyl-L-arginine (ADMA): a possible link between homocyst(e)ine and endothelial dysfunction. *Curr Drug Metab*. 2005;6(1):3-14.
162. Splaver A, Lamas GA, Hennekens CH. Homocysteine and cardiovascular disease: biological mechanisms, observational epidemiology, and the need for randomized trials. *Am Heart J*. 2004;148(1):34-40.
163. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*. 1995;274(13):1049-57.

164. Danesh J, Lewington S. Plasma homocysteine and coronary heart disease: systematic review of published epidemiological studies. *J Cardiovasc Risk*. 1998;5(4):229-32.
165. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA*. 2002;288(16):2015-22.
166. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of the randomized trials. *Am J Clin Nutr*. 2005;82(4):806-12.
167. Clarke R, Halsey J, Lewington S, Lonn E, Armitage J, Manson JE et al. Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: Meta-analysis of 8 randomized trials involving 37485 individuals. *Arch Intern Med*. 2010;170(18):1622-31.
168. Lee M, Hong KS, Chang SC, Saver JL. Efficacy of homocysteine-lowering therapy with folic Acid in stroke prevention: a meta-analysis. *Stroke*. 2010;41(6):1205-12.
169. Mei W, Rong Y, Jinming L, Yongjun L, Hui Z. Effect of homocysteine interventions on the risk of cardiocerebrovascular events: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Int J Clin Pract*. 2010;64(2):208-15.
170. Zhou YH, Tang JY, Wu MJ, Lu J, Wei X, Qin YY, Wang C, Xu JF, He J. Effect of folic acid supplementation on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6(9):e25142.
171. Miller ER 3rd, Juraschek S, Pastor-Barriuso R, Bazzano LA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis of folic acid supplementation trials on risk of cardiovascular disease and risk interaction with baseline homocysteine levels. *Am J Cardiol*. 2010;106(4):517-27.
172. Yang HT, Lee M, Hong KS, Ovbiagele B, Saver JL. Efficacy of folic acid supplementation in cardiovascular disease prevention: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Intern Med*. 2012;23(8):745-54.

173. Huo Y, Qin X, Wang J, Sun N, Zeng Q, Xu X, Liu L, Xu X, Wang X. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: new insight from a meta-analysis. *Int J Clin Pract.* 2012;66(6):544-51.
174. Wang ZM, Zhou B, Nie ZL, Gao W, Wang YS, Zhao H, Zhu J, Yan JJ, Yang ZJ, Wang LS. Folate and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of prospective studies. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012;22(10):890-99.
175. Qin X, Xu M, Zhang Y, Li J, Xu X, Wang X et al. Effect of folic acid supplementation on the progression of carotid intima-media thickness: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis.* 2012;222(2):307-13.
176. Potter K, Hankey GJ, Green DJ, Eikelboom J, Jamrozik K, Arnolda LF. The effect of long-term homocysteine-lowering on carotid intima-media thickness and flow-mediated vasodilation in stroke patients: a randomized controlled trial and meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord.* 2008;8: 24.
177. Singh PR, Lele SS. Folate gene polymorphisms MTR A2756G, MTRR A66G, and BHMT G742A and risk for coronary artery disease: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16(6):471-75.
178. Holmes MV, Newcombe P, Hubacek JA, Sofat R, Ricketts SL, Cooper J et al. Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. *Lancet.* 2011;378(9791):584-94.
179. Clarke R, Bennett DA, Parish S, Verhoef P, Dötsch-Klerk M, Lathrop M et al. Homocysteine and coronary heart disease: meta-analysis of MTHFR case-control studies, avoiding publication bias. *PLoS Med.* 2012;9(2):e1001177.
180. Jardine MJ, Kang A, Zoungas S, Navaneethan SD, Ninomiya T, Nigwekar SU et al. The effect of folic acid based homocysteine lowering on cardiovascular events in people with kidney disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2012;344:e3533.
181. Pan Y, Guo LL, Cai LL, Zhu XJ, Shu JL, Liu XL et al. Homocysteine-lowering therapy does not lead to reduction in cardiovascular outcomes in chronic

- kidney disease patients: a meta-analysis of randomised, controlled trials. *Br J Nutr.* 2012;108(3):400-407.
182. Qin X, Huo Y, Xie D, Hou F, Xu X, Wang X. Homocysteine-lowering therapy with folic acid is effective in cardiovascular disease prevention in patients with kidney disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr.* *Clin Nutr.* 2013;32(5):722-27.
183. Brito A, Hertrampf E, Olivares M, Gaitán D, Sánchez H, Allen LH et al. Folato, vitamina B12 y salud humana. *Rev Med Chil* 2012;140(11):1464-75.
184. Bailey LB, Gregory JF. Folate metabolism and requirements. *J Nutr.* 1999;129:779-82.
185. Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B12 status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Food Nutr Bull.* 2008;29(2Suppl):S52-S63.
186. Dary O. Nutritional interpretation of folic acid interventions. *Nutr Rev.* 2009;67(4):235-44.
187. Daly LE, Kirke PN, Molloy A, Weir DG, Scott JM. Folate levels and neural tube defects. Implications for prevention. *JAMA.* 1995;274:1698-702.
188. Selhub J, Jacques PF, Dallal G, Choumenkovitch S, Rogers G. The use of blood concentrations of vitamins and their respective functional indicators to define folate and vitamin B12 status. *Food Nutr Bull.* 2008; 29(Suppl):S67-S73.
189. Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B-12 status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(2):666S-72S.
190. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(6):1733-44.
191. Pfeiffer CM, Caudill SP, Gunter EW, Osterloh J, Sampson EJ. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification:

- results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2000. *Am J Clin Nutr.* 2005;82:442–50.
192. Sweeney MR, Staines A, Daly L, Traynor A, Daly S, Bailey SW, Alverson PB, Ayling JE, Scott JM. Persistent circulating unmetabolised folic acid in a setting of liberal voluntary folic acid fortification. Implications for further mandatory fortification? *BMC Public Health.* 2009;9:295.
193. Guillard JC, Favier A, Potier de Courcy G, Galan P, Hercberg S. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease?. 1. Basic data. *Pathol Biol (Paris).* 2003;51(2):101-10.
194. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1999;19:217-46.
195. Refsum H, Ueland PM, Nygård O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med.* 1998;49:31-62.
196. Green R, Miller JW. Vitamin B12 deficiency is the dominant nutritional cause of hyperhomocysteinemia in a folic acid-fortified population. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(10):1048-51.
197. Schiff M, Blom HJ. Treatment of inherited homocystinurias. *Neuropediatrics.* 2012;43(6):295-304.
198. Bogolub C. Elevated homocysteine? Consider testing for folate metabolism gene variants. *Minn Med.* 2012;95(12):39-42.
199. Kim G, Kim H, Kim KN, Son JI, Kim SY, Tamura T et al. Relationship of cognitive function with B vitamin status, homocysteine, and tissue factor pathway inhibitor in cognitively impaired elderly: a cross-sectional survey. *J Alzheimers Dis.* 2013;33(3):853-62.
200. Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003:62-81.
201. Wu CC, Zheng CM, Lin YF, Lo L, Liao MT, Lu KC. Role of homocysteine in end-stage renal disease. *Clin Biochem.* 2012;45(16-17):1286-94.

202. Orzechowska-Pawilojc A, Sworzak K, Lewczuk A, Babinska A. Homocysteine, folate and cobalamin levels in hypothyroid women before and after treatment. *Endocr J.* 2007;54(3):471-76.
203. Sultan N, Khan MA, Malik S. Effect of folic acid supplementation on homocysteine level in postmenopausal women. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2007;19(4):78-81.
204. Zoccolella S, Lamberti SV, Iliceto G, Santamato A, Lamberti P, Logroscino G. Hyperhomocysteinemia in L-dopa treated patients with Parkinson's disease: potential implications in cognitive dysfunction and dementia? *Curr Med Chem.* 2010;17(28):3253-61.
205. 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;76:614–19.
206. Papandreou D, Mavromichalis I, Makedou A, Rousso I, Arvanitidou M. Reference range of total serum homocysteine level and dietary indexes in healthy Greek schoolchildren aged 6-15 years. *Br J Nutr.* 2006;96(4):719-24.
207. Molloy AM, Scott JM. Microbiological assay for serum, plasma, and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method. *Methods Enzymol.* 1997;281:43-53.
208. Shane B. Folate status assessment history: implications for measurement of biomarkers in NHANES. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(1):337S-42S.
209. Phillips DR, Wright AJ. Studies on the response of *Lactobacillus casei* to different folate monoglutamates. *Br J Nutr.* 1982;47(2):183-89.
210. Institute of Medicine. Dietary reference intakes (DRI) for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B₆, folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, DC: National Academy Press, 1998.
211. Shane B, Stokstad EL. Transport and utilization of methyltetrahydrofolates by *Lactobacillus casei*. *J Biol Chem.* 1976;251(11):3405-10.

212. Quinlivan EP, Hanson AD, Gregory JF. The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples. *Anal Biochem.* 2006;348(2):163-84.
213. Ghitis J, Lora C. The folate binding in milk. *Am J Clin Nutr* 1967;20:1-4.
214. Pfeiffer CM, Zhang M, Lacher DA, Molloy AM, Tamura T, Yetley EA et al. Comparison of serum and red blood cell folate microbiologic assays for national population surveys. *J Nutr.* 2011;141(7):1402-09.
215. Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene affects is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13217-20.
216. Pfeiffer CM, Fazili Z, Zhang M. Folate analytical methodology. In: Bailey LB, ed. *Folate in health and disease*, 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010, pp. 517-74.
217. Hardcastle A, Clarke S, Aherne W. Interference by antifolate drugs in a folate competitive protein-binding assay, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1997;39:552-53.
218. Yetley EA, Coates PM, Johnson CL. Overview of a roundtable on NHANES monitoring of biomarkers of folate and vitamin B-12 status: measurement procedure issues. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(Suppl):297S-2S.
219. Fazili Z, Pfeiffer CM, Zhang M. Comparison of serum folate species analyzed by LC-MS/MS with total folate measured by microbiologic assay and Bio-Rad radioassay. *Clin Chem.* 2007;53(4):781-84.
220. Powers HJ, Moat SJ. Developments in the measurement of plasma total homocysteine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3:391-97.
221. Hanson NQ, Eckfeldt JH, Schwichtenberg K, Aras O, Tsai MY. Interlaboratory variation of plasma total homocysteine measurements: results of three successive homocysteine proficiency testing surveys. *Clin Chem* 2002;48:1539-45.
222. Llevadot J, Blanco F, González F. Determinación y utilización de la

- concentración plasmática de homocisteína en la práctica clínica. *Med Clin (Barc)*. 2005;124(14):544-53.
223. Rasmussen K, Møller J. Total homocysteine determination in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 2000;37:627-48.
224. Bremner WF, Holmes EW, Kanabrocki EL, Hermida RC, Ayala D, Garbincius J et al. Circadian rhythm of serum total homocysteine in men. *Am J Cardiol* 2000;86:1153-56, A9-10.
225. Nurk E, Tell GS, Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Plasma total homocysteine is influenced by prandial status in humans: the Hordaland Homocysteine Study. *J Nutr* 2001;131:1214-16.
226. Ohrvik VE, Witthoft CM. Human folate bioavailability. *Nutrients*. 2011;3(4):475-90.
227. Melse-Boonstra A, Verhoef P, West C. Quantifying folate bioavailability: a critical appraisal of methods. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004;7(5):539-45.
228. Prinz-Langenohl R, Brönstrup A, Thorand B, Hages M, Pietrzik K. Availability of food folate in humans. *J Nutr*. 1999; 129(4):913-16.
229. CDC. Centers for Disease and Control and Prevention, Atlanta, GA, USA. *Water-Soluble Vitamins & Related Biochemical Compounds* Disponible en: http://www.cdc.gov/nutritionreport/99-02/part_1.html (Consultado 5 de abril de 2013).
230. McNulty H, Pentieva K. Folate bioavailability. *Proc Nutr Soc*. 2004;63(4):529-36.
231. Cahill, E., McPartlin, J. & Gibney, M. J. The effects of fasting and refeeding healthy volunteers on serum folate levels. *Int. J. Vitam. Nutr. Res*. 1998;68:142-45.
232. Witthoft C, Stralsjo L, Berglund G, Lundin E. A human model to determine folate bioavailability from food: a pilot study for evaluation. *Scand J Nutr* 2003;47:6-18

233. Venn BJ, Green TJ, Moser R, Mann JI. Comparison of the effect of low-dose supplementation with L-5-methyltetrahydrofolate or folic acid on plasma a randomized placebo-controlled study. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(3):658-62.
234. Wright AJ, King MJ, Wolfe CA, Powers HJ, Finglas PM. Comparison of (6 S)-5-methyltetrahydrofolic acid v. folic acid as the reference folate in longer-term human dietary intervention studies assessing the relative bioavailability of natural food folates: comparative changes in folate status following a 16-week placebo-controlled study in healthy adults. *Br J Nutr.* 2010;103(5):724-729.
235. Houghton LA, Sherwood KL, Pawlosky R, Ito S, O'Connor DL. [6S]-5-Methyltetrahydrofolate is at least as effective as folic acid in preventing a decline in blood folate concentrations during lactation. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(4):842-50.
236. Lamers Y, Prinz-Langenohl R, Brämswig S, Pietrzik K. Red blood cell folate concentrations increase more after supplementation with [6S]-5-methyltetrahydrofolate than with folic acid in women of childbearing age. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(1):156-61.
237. Serra-Majem LL, Aranceta J. *Nutrición y Salud Pública. Métodos, Bases Científicas, Aplicaciones.* 2ª ed. Barcelona: Masson S.A, 2006, pp. 21
238. Sauberlich HE, Kretsch MJ, Skala JH, Johnson HL, Taylor PC. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am J Clin Nutr.* 1987;46(6):1016-28.
239. Cuskelly GJ, McNulty H, Scott JM. Fortification with low amounts of folic acid makes a significant difference in folate status in young women: implications for the prevention of neural tube defects. *Am J Clin Nutr.* 1999;70(2):234-39.
240. 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(6):1388-97.
241. Bailey LB. Dietary Reference Intakes for folate: The debut of Dietary Folate Equivalents. *Nutr Rev.* 1998;56(10):294-99.

242. Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética. Ingesta Dietética de Referencia (IDR) para Población Española, 2010. *Act Diet.* 2010;14(4):196-97.
243. World Health Organization(WHO) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Preparation and use of food-based dietary guidelines. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/x0243e/x0243e00.htm> (Consultado 20 de diciembre de 2012).
244. World Health Organization(WHO). Promoting proper feeding for infants and young children. Disponible en:
<http://www.who.int/nutrition/topics/infantfeeding/en/index.html> (Consultado 28 de diciembre de 2012).
245. World Health Organization(WHO). Global database on the Implementation of Nutrition Action (GINA). Disponible en <http://www.who.int/nutrition/gina/en/index.html> (Consultado el 20 de diciembre de 2012).
246. The World Health Report 2002: reducing risks, promoting healthy life: overview. Geneva, World Health Organization, 2002 (WHO/WHR/02.1).
247. Oldroyd J, Burns C, Lucas P, Haikerwal A, Waters E. The effectiveness of nutrition interventions on dietary outcomes by relative social disadvantage: a systematic review. *J Epidemiol Community Health* 2008;62(7):573-79.
248. World Health Organization(WHO) and Food and Agriculture Organization(FAO). Nations. Allen L, de Benoist B, Dary O, Hurrell R. Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva. 2006, pp. 13.
249. Backstrand JR. The history and future of food fortification in the United States: a public health perspective. *Nutr Rev* 2002;60:15-26.
250. Bürgi H, Supersaxo Z, Selz B. Iodine deficiency diseases in Switzerland one hundred years after Theodor Kocher's survey: a historical review with some new goitre prevalence data. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1990;123(6):577-90.
251. Dary O. Establishing safe and potentially efficacious fortification contents for

- folic acid and vitamina B12. *Food Nutr Bull* 2008; 29(2 Suppl):S214-S224.
252. World Health Organization (WHO). CHOosing Interventions that are Cost Effective (WHO-CHOICE). Disponible en: <http://www.who.int/choice/book/en/index.html> Consultado (28 de diciembre de 2012).
253. Horton S. The economics of food fortification. *J Nutr.* 2006;136(4):1068-71.
254. CODEX ALIMENTARIUS. Principios generales para la adición de nutrientes esenciales a los alimentos Cac/gl 09-1987 (enmendados en 1989, 1991) Disponible en http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp . Consultado (20 de diciembre de 2012).
255. Nestel P, Briend A, de Benoist B, Decker E, Ferguson E, Fontaine O, Micardi A, Naluloba R. Complementary food supplements to achieve micronutrient adequacy for infants and young children. *J Ped Gastroent Nutr* 2003;36:316-28.
256. Zlotkin S, Arthur P, Antwi KY, Yeunh G. Treatment of anemia with microencapsulated ferrous fumarate plus ascorbic acid supplied as sprinkles to complementary (weaning) foods. *Am J Clin Nutr* 2001;74:791-95.
257. Chávez JF. Lineamientos de la Política Nutricional para combatir la deficiencia de Hierro. Fortificación de Alimentos. *An Venez Nutr* 2005;18(1):49-54.
258. 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.
259. Sacco JE, Tarasuk V. Health Canada's proposed discretionary fortification policy is misaligned with the nutritional needs of Canadians. *J Nutr.* 2009;139(10):1980-86.
260. Rasmussen SE, Andersen NL, Dragsted LO, Larsen JC. A safe strategy for addition of vitamins and minerals to foods. *Eur J Nutr.* 2005;45:123-35.
261. Aeberli I, Hurrell RF, Zimmermann MB. Overweight children have higher circulating hepcidin concentrations and lower iron status but have dietary iron intakes and bioavailability comparable with normal weight children. *Int J Obes (Lond).* 2009;33(10):1111-17.

262. Fairfield KM, Fletcher RH. Vitamins for chronic disease prevention in adults: scientific review. *JAMA* 2002;287(23):3116-26.
263. Dary O, Freire W, Kim S. Iron compounds for food fortification: guidelines for Latin America and the Caribbean 2002. *Nutr Rev* 2002;60:S50–S61.
264. Allen LH, Haskell M. Estimating the potential for vitamin A toxicity in women and young children. *J Nutr.* 2002; 132 (9 Suppl):2907S–19S.
265. Scrimshaw N. La Fortificación de Alimentos: Una Estrategia Nutricional Indispensable. *An Venez Nutr* 2005; 1(18):164-68
266. Hurrell R, Ranum P, de Pee S, Biebinger R, Hulthen L, Johnson Q, Lynch S. Revised recommendations for iron fortification of wheat flour and an evaluation of the expected impact of current national wheat flour fortification programs. *Food Nutr Bull.* 2010;31(1 Suppl):S7-S21.
267. Dary O, Martínez C, Guamuch M. Sugar fortification with vitamin A in Guatemala: the program's successes and pitfalls. In Freire, W. B., editor. *Nutrition and an active life: from knowledge to action.* Scientific and Technical Publication No. 612. Washington, DC: Pan American Health Organization; 2005, pp. 43–59.
268. Huo J, Sun J, Huang J, Li W, Wang L, Selenje L, Gleason GR, Yu X. Effectiveness of fortified flour for enhancement of vitamin and mineral intakes and nutrition status in northwest Chinese villages. *Food Nutr Bull.* 2012;33(2):161-68.
269. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva, World Health Organization, 2003 (WHO Technical Report Series No. 916).
270. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Human Vitamin and Mineral Requirements: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. (OMS, FAO) Rome: Food and Agriculture Organization, 2002.
271. Food and Agriculture Organization/World Health Organization/United Nations University. Human Energy Requirements: Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Geneva: World Health Organization, 2004.

272. Food and Agriculture Organization/World Health Organization /UNU. Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. Geneva: World Health Organization, 2007. WHO Technical Report Series No. 935.
273. Uauy R, Hawkesworth S, Dangour A. Food dietary guidelines for healthier populations: International Consideration. Chapter 10, pp. 1518.
274. Valiente S, Uauy R. Evolucion de la nutrición y alimentación en Chile en el siglo XX. Rev chil nutr. 2002;29(1):54-61.
275. República de Chile. Cámara de Diputados. Memoria Histórica. Disponible en: <http://www.camara.cl/memoria/hito.aspx?prmHITOID=25> (Consultado 2 de enero de 2013).
276. Olivares M, Pizarro F, Hertrampf E, Walter T, Arredondo M, Letelier A. Fortificación de Alimentos con hierro en Chile. Rev chil nutr 2000;27:340-344.
277. Peña G, Pizarro F, Hertrampf E. Contribución del hierro del pan en la dieta chilena. Rev Med Chil. 1991;119(7):753-57.
278. Olivares M, Walter T, Hertrampf E, Pizarro F, Stekel A. Prevention of iron deficiency by milk fortification. The Chilean experience. Acta Paediatr Scand Suppl. 1989;361:109-13.
279. Olivares M, Hertrampf E, Pizarro F, Walter T, Cayazzo M, Llaguno S et al. Hemoglobin-fortified biscuits: bioavailability and its effect on iron nutriture in school children. Arch Latinoam Nutr. 1990;40(2):209-20.
280. Torrejón CS, Castillo-Durán C, Hertrampf ED, Ruz M. Zinc and iron nutrition in Chilean children fed fortified milk provided by the Complementary National Food Program. Nutrition; 2004;20(2):177-80.
281. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Programa de Fortificación de Harinas. Disponible en: http://www.minsal.gob.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_alimentos/pr ot_fortificacion.html (Consultado 2 de enero de 2013).
282. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Manual de atención personalizada en el proceso reproductivo. Salud de la Mujer 2008. Disponible en: http://www.minsal.gob.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_salud_delam

- ujer/saludinmigrantespresentacion.html (Consultado 2 de enero de 2013).
283. Riumalló J, Pizarro T, Rodríguez L, Benavides X. Programas de Suplementación Alimentaria y de Fortificación de Alimentos con Micronutrientes en Chile. Cuadernos Médico-Sociales 2004;43(1):53-60.
 284. Pozo MM, Rodewald AM, Biolley E, Zvaighaft A, Leiva L, Muzzo S. Prevalencia de bocio endémico en escolares del centro y sur de Chile. Rev Chil Pediatr 1989;60:359-62.
 285. Muzzo S, Leiva L, Ramírez I, Carvajal F, Biolley E. Nutrición de yodo en escolares de una zona con alta ingesta de yodo (Calama) comparada con zona de ingesta normal (Punta Arenas). Rev chil nutr 2005;32:28-35.
 286. López-Rodríguez G, Muzzo S. Evolución de la nutrición de yodo en la población chilena. Rev chil nutr 2006;33(2):204-6.
 287. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Norma de uso de fluoruros en prevención odontológica 2008. Disponible en http://www.minsal.gob.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_salud_bucal/normasymanuales.html [Consultado 3 de diciembre de 2012].
 288. Mendoza V C. El dilema ético de la fluoración del agua potable. Rev. méd. Chile 2007;135(11):1487-93.
 289. McDonagh MS, Whiting PF, Wilson PM, Sutton AJ, Chestnutt I, Cooper J, et al. Systematic review of water fluoridation. BMJ 2000;321:855-59.
 290. MINSAL. Lineamientos estratégicos salud buco-dental 2000-2010. Disponible en: http://www.minsal.cl/ici/salud_bucal/documentos/lineamientos_estrategicos_2000_2010.pdf (Consultado 2 enero de 2013).
 291. Vio F, Albala C. Nutrition policy in the Chilean transition. Public Health Nutr. 2000;3(1):49-55.
 292. Albala C, Vio F, Kain J, Uauy R. Nutrition transition in Chile: determinants and consequences. Public Health Nutr. 2002;5(1A):123-28.
 293. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the use of

- folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR Recomm. Rep.* 1992;41:1-7.
294. Alasfoor D, Elsayed MK, Mohammed AJ. Spina bifida and birth outcome before and after fortification of flour with iron and folic acid in Oman. *East Mediterr Health J.* 2010;16(5):533-38.
295. Food and Drug Administration. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. Final Rule. 21 CFR Parts 136, 137, and 139. *Fed. Regist.* 1996;61:8781-89.
296. Crider KS, Bailey LB, Berry RJ. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients.* 2011;3(3):370-84.
297. Food Fortification Initiative(FFI). Global Progress. Disponible en http://www.ffinetwork.org/global_progress/index.php (Consultado 5 de febrero de 2013).
298. WHO, FAO, UNICEF, GAIN, MI, FFI. Recommendations on wheat and maize flour fortification. Meeting Report: Interim Consensus Statement. Geneva, World Health Organization, 2009. Disponible en http://www.who.int/nutrition/publications/micro-nutrients/wheat_maize_fort.pdf (Consultado 4 de febrero de 2013).
299. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Estudio carga de enfermedad, componente cuantitativo del estudio de priorización de inversiones. Ministerio de Salud. Chile, 1996.
300. Albala C, Vio F, Yáñez M. Transición Epidemiológica en América Latina: Comparación de Cuatro Países. *Rev Med Chile* 1997;125:719-27.
301. Gobierno de Chile. Norma Técnica para la Fortificación de la Harina de trigo con Vitaminas y Minerales. Diciembre, 1999.
302. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Protección de la Salud. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Disponible en: http://www.minsal.gob.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_alimentos/pr_ot_alim_y_nutr.html Consultado el 5 de febrero de 2013.

303. Konings EJ. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. *J AOAC Int.* 1999;82(1):119-27.
304. Osseyi ES, Wehling RL, Albrecht JA. Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. *J Chromatogr A* 1998; 826(2):235-40.
305. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Programas de Fortificación de Alimentos. Seminario de Fortificación de Harinas. Disponible en http://www.minsal.gob.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_alimentos/prot_fortificacion.html (Consultado el 5 de febrero de 2013).
306. Grosse SD, Waitzman NJ, Romano PS, Mulinare J. Reevaluating the benefits of folic acid fortification in the United States: economic analysis, regulation, and public health. *Am J Public Health.* 2005; 95(11):1917-22.
307. Bentley TG, Weinstein MC, Willett WC, Kuntz KM. A cost-effectiveness analysis of folic acid fortification policy in the United States. *Public Health Nutr.* 2009;12(4):455-467.
308. Llanos A, Hertrampf E, Cortes F, Pardo A, Grosse SD et al. Cost-effectiveness of a folic acid fortification program in Chile. *Health Policy.* 2007;83(2-3):295-303.
309. Sayed AR, Bourne D, Pattinson R, Nixon J, Henderson B. Decline in the prevalence of neural tube defects following folic acid fortification and its cost-benefit in South Africa. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008;82(4):211-16.
310. Rabovskaja V, Parkinson B, Goodall S. The cost-effectiveness of mandatory folic acid fortification in Australia. *J Nutr.* 2013;143(1):59-66.
311. US Food and Drug Administration. Food standards: amendment of the standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. *Federal Register.* 1993;58:53305-12.
312. Romano PS, Waitzman NJ, Scheffler RM, Pi RD. Folic acid fortification of grain: an economic analysis. *Am J Public Health.* 1995;85:667-76.

313. Kelly AE, Haddix AC, Scanlon KS, Helmick CG, Mulinare J. Cost-effectiveness of strategies to prevent neural tube defects. In: Gold MR, Siegel JE, Russell LB, Weinstein MC, eds. *Cost-Effectiveness in Health and Medicine*. New York, NY: Oxford University Press; 1996, pp. 312–49.
314. Disease Control Priorities Project (DCPP). *Disease Control Priorities in Developing Countries*. Disponible en <http://www.dcp2.org/pubs/DCP> (Consultado 5 de marzo de 2013).
315. Bower C, de Klerk N, Hickling S, Ambrosini G, Flicker L, Geelhoed E et al. Assessment of the potential effect of incremental increases in folic acid intake on neural tube defects in Australia and New Zealand. *Aust N Z J Public Health*. 2006;30(4):369-74.
316. Dalziel K, Segal L, Katz R. Cost-effectiveness of mandatory folate fortification v. other options for the prevention of neural tube defects: results from Australia and New Zealand. *Public Health Nutr*. 2010;13(4):566-78.
317. Verkaik-Kloosterman J, McCann MT, Hoekstra J, Verhagen H. Vitamins and minerals: issues associated with too low and too high population intakes. *Food Nutr Res*. 2012;56.
318. Scientific Committee on Food: European Commission (2000): Opinions of the scientific committee for food (arsenic, barium, fluoride, boron and manganese in natural mineral waters). European Commission: Reports of the Scientific Committee for Food _ Food Science and Techniques. Luxembourg. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/reports_en.html (Consultado el 14 de agosto de 2013).
319. National Academy Press. *Science and Judgment in Risk Assessment* Committee on risk assessment of hazardous air pollutants board on environmental studies and toxicology commission on Life Sciences National Research Council (NAP). Washington D.C., 1994. Disponible en: <http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=030904894X> (Consultado el 15 de agosto de 2013).
320. Organización Mundial de la Salud y Organización de las Naciones Unidas para

- la Agricultura y la Alimentación. Análisis de riesgos relativos a la inocuidad de los alimentos. Guía para las autoridades nacionales de inocuidad de los alimentos. (OMS-FAO). Roma, 2007. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/010/a0822s/a0822s00.htm> (Consultado el 15 de agosto de 2013).
321. A Model for Establishing Upper Levels of Intake for Nutrients and Related Substances Report of a Joint FAO/WHO Technical Workshop on Nutrient Risk Assessment WHO Headquarters, Geneva, Switzerland 2-6 May 2005. Disponible en: http://www.who.int/ipcs/highlights/full_report.pdf (Consultado el 15 de agosto de 2013).
322. Renwick AG, Flynn A, Fletcher RJ, Muller DJG, Tuijelaars S, Verhagen H. Risk-benefit analysis of micronutrients. *Food Chem Toxicol* 2004;42:1903-22.
323. Hoekstra J, Verkaik-Kloosterman J, Rompelberg C, van Kranen H, Zeilmaker M, Verhagen H, et al. Integrated risk-benefit analyses: method development with folic acid as example. *Food Chem Toxicol* 2008;46:893-909.
324. European Food Safety Authority. Report of the public consultation on the EFSA draft guidance on human health risk-benefit assessment of foods. *EFSA J* 2010; 8:1674 [48 pp.]
325. Tjihuis MJ, de Jong N, Pohjola MV, Gunnlaugsdóttir H, Hendriksen M, Hoekstra J et al. State of the art in benefit-risk analysis: food and nutrition. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(1):5-25.
326. Verhagen H, Tjihuis MJ, Gunnlaugsdóttir H, Kalogeras N, Leino O, Luteijn JM, et al. State of the art in benefit-risk analysis: introduction. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(1):2-4.
327. Hoekstra J, Hart A, Boobis A, Claupein E, Cockburn A, Hunt A, Knudsen I, Richardson D, Schilter B, Schütte K, Torgerson PR, Verhagen H, Watzl B, Chiodini A. BRAFO tiered approach for Benefit-Risk Assessment of Foods. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(Suppl 4):S684-S698.

328. Hart A, Hoekstra J, Owen H, Kennedy M, Zeilmaker MJ, de Jong N, Gunnlaugsdottir H. Qalibra: a general model for food risk-benefit assessment that quantifies variability and uncertainty. *Food Chem Toxicol.* 2013;54:4-17.
329. World Health Organization(WHO) Global Burden of Disease 2004 Update: Disability Weights for Diseases and Conditions. Disponible en: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD2004_DisabilityWeights.pdf (Accesado 15 agosto de 2013).
330. Tomaszewski JJ, Cummings JL, Parwani AV, Dhir R, Mason JB, Nelson JB, Bacich DJ, O'Keefe DS. Increased cancer cell proliferation in prostate cancer patients with high levels of serum folate. *Prostate.* 2011;71(12):1287-93.
331. Stevens VL, McCullough ML, Sun J, Gapstur SM. Folate and other one-carbon metabolism-related nutrients and risk of postmenopausal breast cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(6):1708-15.
332. Kim YI. Folate: a magic bullet or a double edged sword for colorectal cancer prevention? *Gut* 2006;55:1387-89.
333. Lamers Y. Folate recommendations for pregnancy, lactation, and infancy. *Ann Nutr Metab.* 2011;59(1):32-37.
334. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. *Encuesta Nacional de Salud ENS 2009-2010.* Disponible en www.redsalud.gov.cl (Consultado el 6 de septiembre de 2012).
335. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA Group. Reprint--preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Phys Ther.* 2009;89(9):873-80.
336. Guerra JA, Muñoz PM, Santos Lozano JM. Las revisiones sistemáticas, niveles de evidencia y grados de recomendación. Disponible en <http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/archivos/Lectura19.pdf>. (Consultado 12 marzo de 2013)
337. Quinlivan EP, Gregory JF 3rd. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr* 2003;77:221-25.

338. Quinlivan EP, Gregory JF 3rd. Reassessing folic acid consumption patterns in the United States (1999-2004): potential effect on neural tube defects and overexposure to folate. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1773-79.
339. Pontificia Universidad Católica de Chile. Políticas de Calidad de Laboratorios Clínicos. Disponible en <http://redsalud.uc.cl/link.cgi/MS/Laboratorios/Somos/2626>(Consultado el 6 de septiembre de 2012).
340. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. Mini-Mental State: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12:189-98.
341. Chatfield M, Matthews F, Brayne C, and the medical research council cognitive function and ageing study. Using the Mini-Mental State Examination for Tracking Cognition in the Older Population Based on Longitudinal Data. *J Am Geriatr Soc* 2007;55:1066–71,
342. Quiroga P, Albala C, Klaasen G. Validation of a screening test for age associated cognitive impairment, in Chile. *Rev Med Chil.* 2004;132(4):467-78.
343. Icaza, MG, Albala C. Minimental State Examination: Análisis estadístico del estudio de demencia en Chile para validar una versión abreviada. *Investigaciones en Salud Pública: Documentos Técnicos, OPS, Washington DC.* 1999.
344. Pfeffer RI, Kurosaki TT, Chance JM, et al. Use of the Mental Function Index in older adults: reliability, validity, and measurement of change over time. *Am J Epidemiol* 1984;120:922-35.
345. Instituto Nacional de Estadísticas. Chile Ciudades, Pueblos y Aldeas. 1992 Disponible en: <http://www.inevalparaiso.cl/archivos/files/pdf/ETNIAS/introduccion.pdf> (Consultado el 15 de marzo de 2013).
346. Panamerican Health Organization (PAHO). Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de Diabetes Mellitus tipo 2. Disponible en

- <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/nc/dia-guia-alad.pdf#page=18&zoom=auto,0,644> (Consultado el 15 de marzo de 2013).
347. Coleman A, Freeman P, Steel S, Shennan A. Validation of the Omron MX3 Plus oscillometric blood pressure monitoring device according to the European Society of Hypertension international protocol. *Blood Press Monit.* 2005;10:165-68.
348. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr et al. The National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7). *Hypertension.* 2003;42:1206-52.
349. Sánchez H, Albala C, Hertrampf E, Verdugo R, Lavados M, Castillo JL et al. Prevalence of vitamin B₁₂ deficiency in older adults. *Rev Med Chile* 2010;138(1):44-52.
350. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B₁₂ status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr.* 2007;85(1):193-200.
351. Ulrich CM. Folate and cancer prevention: a closer look at a complex picture. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86(2):271-3.
352. Lucock M, Yates Z. Folic acid fortification: a double-edged sword. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2009;12(6):555-64.
353. Smith AD, Kim YI, Refsum H. Is folic acid good for everyone? *Am J Clin Nutr.* 2008 Mar;87(3):517-33.
354. Sweeney MR, McPartlin J, Scott J. Folic acid fortification and public health: report on threshold doses above which unmetabolised folic acid appear in serum. *BMC Public Health* 2007;7:41.
355. Daly S, Mills JL, Molloy AM *et al.* Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. *Lancet* 1997; 350: 1666-69.

356. Wald NJ, Law M, Hoffbrand AV. (Folic acid fortification in the prevention of neural tube defects. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1665-66.
357. Castillo-Lancellotti C, Tur JA, Uauy R. Impact of folic acid fortification of flour on neural tube defects: a systematic review. *Public Health Nutr.* 2013;16(5):901-11.
358. De Wals P, Rusen ID, Lee NS et al. Trend in prevalence of neural tube defects in Quebec. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2003; 67: 919-23.
359. De Wals P, Tairou F, Van Allen MI et al. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *N Engl J Med* 2007; 357: 135-142.
360. Meyer RE, Siega-Riz AM. Sociodemographic patterns in spina bifida birth prevalence trends--North Carolina, 1995-1999. *MMWR Recomm Rep* 2002, 51 (RR13): 12-5.
361. Hertrampf E, Cortés F. Folic acid fortification of wheat flour: Chile. *Nutr Rev.* 2004; 62 Suppl.1, S44-48.
362. Calvo EB, Biglieri A. Impact of folic acid fortification on women's nutritional status and on the prevalence of neural tube defects. *Arch Argent Pediatr* 2008; 106: 492-98.
363. Berry RJ, Li Z, Erickson JD et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *N Engl J Med* 1999; 341: 1485-90.
364. Thompson MD, Cole DE, Ray JG. Vitamin B-12 and neural tube defects: the Canadian experience. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: S697-S701.
365. Hao L, Yang Q-H, Li Z et al. Folate status and homocysteine response to folic acid doses and withdrawal among young Chinese women in a large-scale randomized double-blind trial. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 448-57
366. Castillo C, Tur JA, Uauy R. Flour fortification with folic acid in Chile. Unintended consequences. *Rev Med Chil.* 2010 ;138 (7):832-40.
367. Sie KK, Medline A, van Weel J, Sohn KJ, Choi SW, Croxford R, Kim YI. Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on colorectal cancer risk in the offspring. *Gut.* 2011 ;60:1687-94.

368. Castillo-Lancellotti C, Tur Marí JA, Uauy Dagach R. Folic acid supplementation and colorectal adenoma recurrence: systematic review. *Nutr Hosp*. 2012; 27(1):13-21.
369. Martínez ME, Henning SM, Alberts DS. Folate and colorectal neoplasia: relation between plasma and dietary markers of folate and adenoma recurrence. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(4):691-7.
370. Martínez ME, Giovannucci E, Jiang R, Henning SM, Jacobs ET, Thompson P, et al. Folate fortification, plasma folate, homocysteine and colorectal adenoma recurrence. *Int J Cancer*. 2006; 119(6):1440-6.
371. La Vecchia C, Negri E, Pelucchi C, Franceschi S. Dietary folate and colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2002;102(5):545-7.
372. Mayor-Olea A, Callejón G, Palomares AR, Jiménez AJ, Gaitán MJ, Rodríguez A, et al. Human genetic selection on the MTHFR 677C>T polymorphism. *BMC Med Genet*. 2008; 9:104.
373. Kotsopoulos J, Sohn KJ, Martin R, Choi M, Renlund R, et al. Dietary folate deficiency suppresses N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis* 2003;24(5):937-44.
374. Kotsopoulos J, Medline A, Renlund R, Sohn KJ, Martin R, Hwang Sw, et al. Effects of dietary folate on the development and progression of mammary tumors in rats. *Carcinogenesis* 2005; 26(9):1603-12.
375. Castillo-L C, Tur JA, Uauy R. Folate and breast cancer risk: a systematic review. *Rev Med Chil*. 2012 ;140(2):251-60.
376. Zhang Sm, Willett Wc, Selhub J, Hunter Dj, Giovannucci El, Holmes Md, et al. Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, homocysteine, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(5):373-80.
377. Lin J, Lee Im, Cook Nr, Selhub J, Manson Je, Buring Je, et al. Plasma folate, vitamin B-6, vitamin B-12, and risk of breast cancer in women. *Am J Clin Nutr* 2008;87(3):734-43.

378. Charles D, Ness Ar, Campbell D, Davey Smith G, Hall Mh. Taking folate in pregnancy and risk of maternal breast cancer. *BMJ* 2004; 329(7479):1375-6.
379. Lewis Sj, Harbord Rm, Harris R, Smith Gd. Meta-analyses of observational and genetic association studies of folate intakes or levels and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(22):1607-22.
380. Zintzaras E. Methylenetetrahydrofolate reductase gene and susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. *Clin Genet* 2006;69(4):327-36.
381. Macis D, Maisonneuve P, Johansson H, Bonanni B, Botteri E, Iodice S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and breast cancer risk: a nested-case-control study and a pooled meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2008;107(3):459-60.
382. Roswall N, Olsen A, Christensen J, Dragsted Lo, Overvad K, Tjønneland A. Micronutrient intake and breast cancer characteristics among postmenopausal women. *Eur J Cancer Prev.* 2010;19(5):360-5.
383. Ericson U, Sonestedt E, Ivarsson Mi, Gullberg B, Carlson J, Olsson H, et al. Folate intake, methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, and breast cancer risk in women from the Malmö Diet and Cancer cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(4):1101-10.
385. Stolzenberg-Solomon Rz, Chang Sc, Leitzmann Mf, Johnson Ka, Johnson C, Buys Ss, et al. Folate intake, alcohol use, and postmenopausal breast cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Am J Clin Nutr* 2006;83(4):895-904
386. Vollset SE, Clarke R, Lewington S, Ebbing M, Halsey J, Lonn E, et al. Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: meta-analyses of data on 50,000 individuals. *Lancet.* 2013;381:1029-36.
387. Castillo Lancellotti C, Tur Mari JA, Uauy Dagach R. Effect of folate and related nutrients on cognitive function in older people; systematic review. *Nutr Hosp.* 2012;27(1):90-102.

388. Tettamanti M, Garri MT, Nobili A, Riva E, Lucca U. Low folate and the risk of cognitive and functional deficits in the very old: the Monzino 80-plus study. *J Am Coll Nutr* 2006;25 (6):502-8.
389. Kado DM, Karlamangla AS, Huang MH, Troen A, Rowe JW, Selhub J, et al. Homocysteine versus the vitamins folate, B₆, and B₁₂ as predictors of cognitive function and decline in older high-functioning adults: MacArthur Studies of Successful Aging. *Am J Med* 2005;118 (2):161-7.
390. Clarke R, Sherliker P, Hin H, Molloy AM, Nexo E, Ueland PM, et al. Folate and vitamin B₁₂ status in relation to cognitive impairment and anaemia in the setting of voluntary fortification in the UK. *Br J Nutr* 2008;100 (5):1054-9.
391. Vidal JS, Dufouil C, Ducros V, Tzourio C. Homocysteine, folate and cognition in a large community-based sample of elderly people-the 3C Dijon Study. *Neuroepidemiology* 2008;30 (4):207-14.
392. Lee LK, Shahar S, Rajab N. Serum folate concentration, cognitive impairment, and DNA damage among elderly individuals in Malaysia. *Nutr Res* 2009;29 (5):327-34.
393. Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Hebert LE, Scherr PA, et al. Dietary folate and vitamin B₁₂ intake and cognitive decline among community-dwelling older persons. *Arch Neurol* 2005;62:641-45.
394. Eussen SJ, de Groot LC, Joosten LW, Bloo RJ, Clarke R, Ueland PM, et al. Effect of oral vitamin B-12 with or without folic acid on cognitive function in older people with mild vitamin B₁₂ deficiency: a randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2006; 84 (2):361-70.
395. McMahon JA, Green TJ, Skeaff CM, Knight RG, Mann JI, Williams SM. A controlled trial of homocysteine lowering and cognitive performance. *N Engl J Med* 2006;354 (26):2764-72.
396. Ford AH, Flicker L, Alfonso H, Thomas J, Clarnette R, Martins R, et al. Vitamins B₁₂, B₆, and folic acid for cognition in older men. *Neurology* 2010;75(17):1540-7.

397. Stott DJ, MacIntosh G, Lowe GD, Rumley A, McMahon AD, Langhorne P, et al. Randomized controlled trial of homocysteine-lowering vitamin treatment in elderly patients with vascular disease. *Am J Clin Nutr* 2005;82(6):1320-6.
398. Lewerin C, Matousek M, Steen G, Johansson B, Steen B, Nilsson-Ehle H. Significant correlations of plasma homocysteine and serum methylmalonic acid with movement and cognitive performance in elderly subjects but no improvement from short-term vitamin therapy: a placebo-controlled randomized study. *Am J Clin Nutr* 2005;81(5):1155-62.
399. Malouf R, Grimley Evans J. Folic acid with or without vitamin B₁₂ for the prevention and treatment of healthy elderly and demented people. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(4): CD004514.
400. Wald DS, Kasturiratne A, Simmonds M. Effect of folic acid, with or without other B vitamins, on cognitive decline: meta-analysis of randomized trials. *Am J Med* 2010;123 (6):522-27.
401. Shuaibi AM, House JD, Sevenhuysen GP. Folate status of young Canadian women after folic acid fortification of grain products. *J Am Diet Assoc.* 2008; 108: 2090-4.
402. Ray JG. Efficacy of Canadian folic acid food fortification. *Food Nutr Bull.* 2008; 29: S 225-30.
403. Olivares M, Hertrampf E, Capurro MT, Wegner D. Prevalence of anemia in elderly subjects living at home: role of micronutrient deficiency and inflammation. *Eur J Clin Nutr.* 2000; 54: 834-9.
404. Hirsch S, de la Maza P, Barrera G, Gattás V, Petermann M, Bunout D. The Chilean flour folic acid fortification program reduces serum homocysteine levels and masks vitamin B₁₂ deficiency in elderly people. *J Nutr.* 2002; 132: 289-91.
405. Pfeiffer CM, Hughes JP, Lacher DA, Bailey RL, Berry RJ, Zhang M, Yetley EA, Rader JI, Sempos CT, Johnson CL. Estimation of trends in serum and RBC folate in the U.S. population from pre- to postfortification using assay-adjusted data from the NHANES 1988-2010. *J Nutr.* 2012;142(5):886-93.

406. Ray JG, Vermeulen MJ, Boss SC, Cole DE. Declining rate of folate insufficiency among adults following increased folic acid food fortification in Canada. *Can J Public Health*. 2002;93(4):249-53.
407. Dietrich M, Brown CJ, Block G. The effect of folate fortification of cereal-grain products on blood folate status, dietary folate intake, and dietary folate sources among adult non-supplement users in the United States. *J Am Coll Nutr*. 2005; 24(4):266-74.
408. Ganji V, Kafai MR. Trends in serum folate, RBC 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(1):153-8.
409. Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Programas Alimentarios. Disponible en: http://web.minsal.cl/programas_alimentarios (Consultado el 7 de noviembre de 2013).
410. Castillo C, Tur JA, Uauy R. [Flour fortification with folic acid in Chile. Unintended consequences]. *Rev Med Chil*. 2010;138(7):832-40.
411. Castillo-Lancellotti C, Margozzini P, Valdivia G, Padilla P, Ricardo UauyR, Rozowski J, Tur JA. Nivel sérico de Folato y Vitamina B₁₂ en adultos mayores chilenos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud ENS 2009-10. *Rev Med Chile* 2013;141:1107-16
412. Tucker AM, Stern Y. Cognitive reserve in aging. *Curr Alzheimer Res* 2011;8:354-360.
413. Fernández-Ballesteros R, Botella J, Zamarrón MD et al. Cognitive plasticity in normal and pathological aging. *Clin Interv Aging* 2012;7:15-25.
414. Guerra RO, Alvarado BE, Zunzunegui MV Life course, gender and ethnic inequalities in functional disability in a Brazilian urban elderly population. *Aging Clin Exp Res* 2008; 20:53-61.
415. Zunzunegui MV, Nunez O, Durban M et al. Decreasing prevalence of disability in activities of daily living, functional limitations and poor self-rated health: a 6-year follow-up study in Spain. *Aging Clin Exp Res* 2006;18:352-358.

416. Helmer C. Dementia and marital status at midlife and late life. *BMJ* 2009;339: b1690.
417. Ministerio de Planificación Chile. Transformaciones en las estructuras familiares en Chile. Disponible en: <http://www.ministeriodesarrollosocial.gob.cl/btca/txtcompleto/mideplan/transformac.fam.chilenas.pdf> (Consultado 12 agosto de 2013).
418. Rodríguez-Sánchez E, Mora-Simón S, Patino-Alonso MC et al. Prevalence of cognitive impairment in individuals aged over 65 in an urban area: DERIVA study. *BMC Neurol* 2011;11:147.
419. Gavrilá D, Antunez C, Tormo MJ et al. Prevalence of dementia and cognitive impairment in Southeastern Spain: the Ariadna study. *Acta Neurol Scand* 2009;120:300–7.
420. Clarke R, Sherliker P, Hin H *et al.* Folate and vitamin B₁₂ status in relation to cognitive impairment and anaemia in the setting of voluntary fortification in the UK. *Br J Nutr* 2008;100:1054-59.



UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

Grupo de Investigación en Nutrición Comunitaria y Estrés Oxidativo

y

ciberobn
Centre de Investigació Biomèdica en Red
Fisiopatologia de la Obesitat i Nutrició