

Ingesta de Folato y uso de suplementos de Ácido Fólico durante el embarazo y su efecto sobre el Crecimiento Fetal



Tesis Doctoral

Eva María Navarrete Muñoz

Dirección

Jesús Vioque López, Marisa Rebagliato Ruso y

Manuela García de la Hera



Dr. Enrique Perdiguero Gil, Director del Departamento de Salud Pública, Historia de la Ciencia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández

CERTIFICA:

Que Eva María Navarrete Muñoz ha realizado bajo la coordinación de este Departamento su memoria de tesis doctoral titulada “**Ingesta de Folatos y uso de suplementos de Ácido Fólico durante el embarazo y su efecto sobre el Crecimiento Fetal**”, cumpliendo todos los objetivos previstos, finalizando su trabajo en forma satisfactoria para su defensa pública y capacitándole para optar al grado de doctor.

Lo que certifico en San Juan de Alicante, a once de Mayo del dos mil once

Enrique Perdiguero Gil
Director del Departamento

Jesús Vioque López, Catedrático de Medicina Preventiva y Salud Pública

Marisa Rebagliato Ruso, Profesora Titular en excedencia

Manuela García de la Hera, Profesora Contratada Doctor

CERTIFICAN

Que D^a. **EVA MARIA NAVARRETE MUÑOZ**, Licenciada en Estadística por la Universidad Miguel Hernández de Elche-Alicante, ha realizado los trabajos que componen su tesis doctoral bajo nuestra dirección con el título de **“Ingesta de Folatos y uso de suplementos de Ácido Fólico durante el embarazo y su efecto sobre el Crecimiento Fetal”**

Una vez revisada el presente trabajo reúne las condiciones para ser presentada y defendida como TESIS DOCTORAL

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente certificado en Alicante a 11 de Marzo 2011

Jesus Vioque López

Marisa Rebagliato Ruso

Manuela García de la Hera

Esta tesis doctoral se desarrolla dentro de una de las líneas de investigación del Grupo de Epidemiología de la Nutrición (EPINUT; ver anexo II) de la Universidad Miguel Hernández liderado por el profesor Jesús Vioque, en el que colabora también la profesora Manuela García. Un antecedente de esta investigación se produce en el año 2000 con la publicación de un artículo con la misma temática de esta tesis, “Ingestión de ácido fólico y factores asociados en mujeres adultas de 15 a 44 años de la Comunidad Valenciana” (Vioque *et al.* 2000).

Con mi incorporación en 2007 al grupo de investigación y durante mi periodo de formación en el Master de Salud Pública se me permitió abordar el tema y desarrollar esta tesis doctoral en formato de artículos dentro del Proyecto sobre Infancia y Medio Ambiente (Estudio INMA-Valencia, ver anexo III). Este estudio prospectivo de cohortes se inició en 2003 por la Dra. Marisa Rebagliato junto a otros investigadores para estudiar la influencia del medio ambiente y la dieta sobre el desarrollo fetal y en la infancia. En el primer trabajo se describe la ingesta de Folatos (F) y ácido fólico (AF) durante el embarazo y se analizan los factores predictores del cumplimiento de las recomendaciones dietéticas para la ingesta de estos nutrientes en las embarazadas. En el segundo trabajo, de tipo analítico, examinamos la influencia de la ingesta de F y AF de la dieta y de suplementos sobre el crecimiento fetal. Por último, hemos realizado un tercer trabajo metodológico para analizar la validez del instrumento de evaluación dietética (Cuestionario de Frecuencia Alimentaria, CFA) utilizado para estimar ingesta de F en las embarazadas. La tesis se base en los dos primeros trabajos ya publicados. El tercero está en fase de remisión (anexo I):

1. Eva M^a Navarrete-Muñoz, Daniel Giménez Monzó, Manuela García de la Hera, M^a Dolores Climent, Marisa Rebagliato, Mario Murcia, Carmen Iñiguez, Ferran Ballester, Rosa Ramón, Jesús Vioque. Ingesta Dietética y de suplementos de ácido fólico en mujeres embarazadas de Valencia. **Medicina Clínica** 2010; 135 (14):637-643
2. María A. Pastor-Valero, Eva M^a Navarrete-Muñoz, Marisa Rebagliato, Carmen Iñiguez, Mario Murcia, Alfredo Marco, Ferran Ballester y Jesús Vioque. Periconcepcional folic acid supplementation and anthropometric measures at birth in a cohort of pregnant women in Valencia, Spain. **British Journal Nutrition** 2011; Jan 28:1-9.

Anexo I

Jesús Vioque, Eva M^a Navarrete-Muñoz, Daniel Giménez, Manoli García de la Hera, ,
Marisa Rebagliato, Mario Murcia, Carmen Iñiguez, Ferran Ballester. Validity of a food
frequency questionnaire to assess folic acid intake among pregnant women.



AGRADECIMIENTOS

Son tan importantes las personas que te encuentras por tu camino para hacer crecer profesional y sobre todo personalmente que no se muy bien por donde empezar a agradecer. Pero lo que sí que tengo claro es que sin esos aires de impulso esta tesis no sería una realidad.

Aún recuerdo con cierta sorpresa aquel maravilloso día de Marzo en el cual Nuria Ramón (compañera de carrera) me reenviaba un mail que Jordi Torrubiano (otro compañero de carrera) le envía sobre una oferta de empleo para Estadístico en San Juan. En ese listado habría más de 50 licenciados o diplomados en Estadística. Pero no se porque solo yo conteste a esa oferta. Esta vida llena de conexiones inexplicables que nos guían. Por ello les agradezco a ellos así como a algunos compañeros de carrera que me hicieron este camino más fácil. Gracias Marí, Vir, Mabel, Abel, Isa y Pina.

Sin duda hay tres personas fundamentales en mi carrera profesional que tiene un punto de inflexión con la lectura de esta tesis.

Gracias Marisa Reblagiato por compartir conmigo el Estudio INMA, por aceptar amablemente ser co-directora de esta tesis, y por ofrecerme tu experiencia y conocimiento en el mundo de la Pediatría y la Salud Pública.

Gracias a Manoli García de la Hera, por creer en mi a pesar de no tener un curriculum brillante, por abrirme la puerta de esta carrera profesional, por animarme a acabar esta tesis y sobre todo porque además de hacer aportaciones fundamentales a esta tesis, eres una GRAN persona.

Gracias a Jesús Vioque por tu confianza y apoyo, por tu rigor científico y por tener siempre abierta la puerta de despacho para ayudarme y darme tu mejor opinión pero sobre todo por escuchar todo aquello que te he propuesto. A lo largo de estos años no solo has conseguido que aprenda de este mundo que me apasiona sino que no dejase nunca de disfrutar, emocionarme y entusiasmarme con la Epidemiología. Y espero continuar así.

Gracias a todo el departamento de Salud Pública, Historia de la Ciencia y Ginecología por brindarme un espacio y unos recurso donde llevar a cabo esta tesis. Me gustaría agradecer de forma especial el trabajo que realizan Joaquín Garcia y María José Ramírez, por su buena disposición siempre y por hacer que nuestro trabajo sea mucho más fácil.

Gracias a todos/as mis compañeros/as del Grupo EPINUT, a los que están ahora y los que han pasado por aquí, es y ha sido un placer trabajar con gente sobre todo tan humana como todos

vosotros (Dani, Pablo, Clara, Laura, Adela, Mabel, Jose Antonio, Tanja, Marucha, Manoli y Jesús). Y sobre todo debo dar un Gracias más especial a M. Dolores y Nati por ilusionarse, implicarse y trabajar en cada uno de los proyectos que nos hemos propuesto, pero sobretodo por los magníficos congresos que hemos vivido. No sabéis como os hecho de menos. Y Gracias a Dani por ser mi compañero de fatigas y por darme sabios consejos.

Gracias a todas las familias del proyecto INMA porque sin ellos esta tesis no existiría. Y a todos los investigadores del proyecto, un especial gracias para todos mis compañeros/as de la Cohorte de Valencia por considerarnos parte de su grupo. Gracias Ferran, Carmen, Ana, Sabrina, Amparo, Mario y Marisa.

Gracias a Walter Willett por sus inmersiones en el mundo de la Epidemiología de la Nutrición y por enseñarnos la importancia de los Cuestionarios de Frecuencia Alimentaria

Gracias a todos los EJE's que luchan por que la voz de los jóvenes se escuche en este mundo de la Epidemiología y la Salud Pública. Y un especial gracias a las personas que me han acompañado más directamente en esta andanza: María Jose, Josemi, Quela, Amaia, Alba, Jose, Xavi, Xisca y Laia. Gracias por los buenos momentos vividos en Morata.

Gracias a mis compañeros/as de Burger King por todo el apoyo que me dieron cuando decidí probar suerte en esto de la Epidemiología. Gracias especialmente a Nasrin Krayem y Paola Hernández. Y a todos aquellos amigos que a pesar del tiempo siguen estando ahí, sobre todo a ti Elena.

Gracias a todos los coautores de los trabajos que componen esta tesis porque sin su ayuda y su aportaciones todo hubiese sido más difícil. Un especial gracias a Marucha por el trabajo de efectos. Así como a todos los miembros de todos los proyectos que de forma directa o indirecta he colaborado DDM, CAPUA, entre otros porque de cada uno de ellos aprendido muchas cosas que han hecho mejorar esta tesis.

Y para acabar me gustaría dar las gracias a las personas más importantes en mi vida y sin las cuales nada de lo que hago tendría sentido, mi FAMILIA. Sin vuestro cariño, vuestra ayuda y vuestro apoyo esta tesis nunca habría visto la luz. Gracias José Pedro por aquellos maravillosos años de niñez y por los que nos quedan por vivir. Gracias Luis por ser como un padre para mí y estar conmigo en lo bueno y en lo malo. Gracias yaya porque aunque ahora ya no entiendas lo que es una tesis, siempre has aceptado quien y como soy y he notado tu apoyo. Gracias yayo cuya frase mítica "No hay que conformarse y hay que luchar por lo que uno quiere" probablemente no sería quien soy, no sabes cuanto he aprendido de ti. Gracias a Desirée por enviarme ese curriculum, por leer esta tesis con el corazón y por tu apoyo incondicional en este caminar, pero sobre todo por

comprender como soy. Y por último, pero no en último lugar en importancia, sino todo lo contrario, tengo que darle un Gracias en mayúsculas a mi mami que me ha enseñado todo lo que de verdad importa en la vida, la que me apoyado incondicionalmente pese a que muchas de mis decisiones no hayan sido de su agrado. Gracias por ayudarme a levantarme cuando he caído y por enseñarme que las cosas siempre llegan. Pero sobre todo por enseñarme lo importante que es una madre en la vida de un hijo. Sin vuestra nada hubiese sido posible



	<i><u>Página</u></i>
Lista de Abreviaciones	1
Introducción	3
Folato y/o Ácido Fólico	4
Evaluación de la Ingesta de Folato. Métodos de Evaluación Dietética.	8
Ingesta de Folato y Ácido Fólico y su Relación con la Salud	13
Salud reproductiva	15
Justificación	23
Contexto	23
Hipótesis	25
Objetivos	27
Metodología General	29
Población	29
Variables de estudio	31
Análisis Estadístico	37
Resultados	39
Artículo 1. <i>Medicina Clínica (Barcelona)</i> 2010; 135: 637-643	39
Artículo 2. <i>British Journal Nutrition</i> 2011; Jan 28: 1-9	47
Discusión General	57
Conclusiones	63
Implicaciones para la Salud Pública	65
Bibliografía	67
Anexo I	83
Anexo II	103
Anexo III	105
Anexo IV	109
Anexo V	113

F: Folato.

AF: Ácido Fólico

DTN: Defectos del tubo neural

INMA: Infancia y Medio Ambiente

FIGLU: Ácido Forminoglutamato

CFA: Cuestionario de Frecuencia de Alimentos

R24: Recordatorio de 24 horas

IR: Ingesta diaria recomendada

SGA: pequeño para edad gestacional

SGA-H: pequeño para edad gestacional para talla

SGA-W: pequeño para edad gestacional para peso





La nutrición en el embarazo juega un papel primordial en el desarrollo del feto al tiempo que se satisfacen las necesidades maternas (Fernández Ballart et al. 2006). Un buen estado nutricional previo al embarazo y un aporte adecuado de nutrientes esenciales va a ser determinante del resultado y desarrollo del embarazo. Cualquier déficit nutricional puede producir cambios en la estructura y función de los órganos e incluso llegar a producir alteraciones en el crecimiento, neurodesarrollo y la aparición de malformaciones congénitas (Eichholzer et al. 2006).

En este sentido, es bien conocido que una ingesta adecuada de folatos (F), resulta fundamental en el desarrollo fetal y en concreto para la protección contra los defectos del tubo neural (DTN), segundo defecto congénito más común después de las anomalías cardíacas. El ensayo clínico que demostró de forma rotunda que un aporte periconcepcional de ácido fólico (AF) resultaba clave para prevenir los DTN fue considerado recientemente como uno de los grandes hallazgos del siglo XX en la investigación en nutrición (Katan et al. 2009). Sin embargo, existen aspectos aún por determinar de los posibles efectos de los F o AF durante el embarazo, y recientemente han surgido nuevas hipótesis sobre la posible influencia de éste en el crecimiento fetal (Scholl & Johnson 2000) y la posibilidad de que dicho crecimiento pueda relacionarse al desarrollo de enfermedades crónicas en la vida adulta (Godfrey & Barker 2001). Además algunos autores advierten de los posibles efectos indeseables de una suplementación con AF en algunos grupos de población, especialmente cuando las ingestas sobrepasan límites considerados como tolerables (Martínez-Frías et al. 2003, Lucock & Yates 2005, Martínez-Frías & ECEM 2007, Ebbing et al. 2009). El conocer la situación actual respecto a la ingesta dietética de F y el uso de suplementos de AF durante el embarazo, y de posibles efectos indeseables relacionados con un uso inadecuado de estos en el embarazo ha justificado la realización de esta tesis doctoral. Previamente a entrar en los detalles hacemos una breve presentación de las características del nutriente tanto en su forma natural, folatos (F), como en su forma sintética habitualmente utilizada en suplementos y fortificación alimentaria, denominada genéricamente como ácido fólico (AF).

Folato y/o Ácido Fólico

El descubrimiento

El AF fue descrito en 1930 como un factor capaz de curar la anemia macrocítica debida a deficiencias dietéticas en las mujeres embarazadas de la India. Dicho compuesto, que es soluble en agua, fue denominado Factor Willis o vitamina B11. En ese tiempo, las investigaciones alrededor del AF se relacionaron con el estudio de la anemia y con ciertos factores de crecimiento en los animales. En esos trabajos se comprobó que en el hígado, en la levadura y en algunos vegetales de hojas verdes existían sustancias necesarias para el crecimiento y la nutrición de determinados microorganismos y especies animales (Wills 1931). A estas sustancias se les dieron varios nombres: factor de fermentación de *Lactobacillus casei*, factor de eluato de norita, vitamina M, vitamina B, vitamina B9, vitamina B10, vitamina B11, factores R, S y U y factor SLR, entre otros.

Originalmente, la extracción del AF se llevó a cabo a partir de extractos de hígado crudo, aunque posteriormente se aisló en las hojas de espinacas; de ahí su denominación actual (del latín folio, hoja). Una nota de la doctora Willis da cuenta de los esfuerzos que se hicieron para obtenerlo: “Usando el *Streptococcus lactis* como organismo de prueba, hemos obtenido un ácido con propiedades fisiológicas muy interesantes. Se han necesitado cuatro toneladas de espinacas para realizar las primeras fases de concentración”. El folato fue identificado como una sustancia contenida en la levadura de cerveza durante 1930 y fue extraída de la espinaca después en 1941 (Mitchell et al. 1998). Fue sintetizada por primera vez en 1945 (Angier et al. 1945)

Folato y Ácido Fólico

El folato (F) y el ácido fólico (AF), son dos términos que se utilizan indistintamente para referirse a la vitamina hidrosoluble del complejo B también llamada B9, necesaria para la formación de proteínas estructurales y hemoglobina. Esta no posee actividad coenzimática, pero sí su forma reducida, el ácido tetrahidrofólico que actúa como transportador intermediario de grupos con un átomo de carbono, que se precisa en la síntesis de purinas, compuestos que forman parte de los nucleótidos, sustancias presentes en el ADN y el ARN, y que resultan esenciales para su síntesis durante la división celular. Otra de sus principales funciones es que actúa en la transferencia de grupos metilo y

metileno. Este nutriente está también presente en el metabolismo de la homocisteína y ayuda a mantener los niveles normales de este amino ácido. Una deficiencia de este nutriente puede causar una amplia variedad de problemas en salud, tales como anemia megaloblástica, desórdenes neurológicos e hiperhomocisteinemia, en la actualidad considerado factor de riesgo cardiovascular.

El AF se refiere a la forma totalmente oxidada del compuesto químico que no es natural y que no se encuentra disponible en los alimentos. Las principales fuentes de esta forma son los suplementos dietéticos o los alimentos enriquecidos. Por otro lado, el término F representa la forma natural, disponible en el cuerpo humano así como en los alimentos tanto de origen animal como de origen vegetal como se muestra en la Figura 1. De hecho, y aunque tradicionalmente los extractos de levadura, hígado, riñón, vegetales de hoja verde, cítricos y la fruta han sido descritos como las principales fuentes del nutriente, cantidades moderadas de esta vitamina han sido encontradas en el pan, las patatas y los productos lácteos, que consumidos en grandes cantidades pueden ser contribuidores significativos de la ingesta total de F (Konings et al. 2001, Winkels et al. 2007, Combs 2008)

Figura 1. Contenidos de folato de algunos alimentos. .

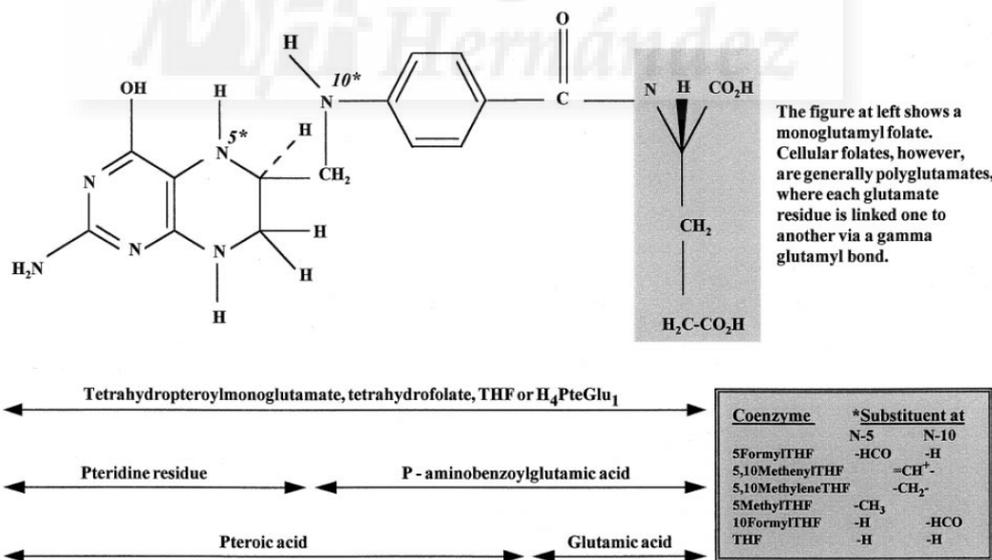
Alimento	µg/100 g
Soja	240
Hígado	227
Legumbres	180
Acelgas, espinacas	140
Almendras, avellanas	110
Remolacha, puerro	90
Guisantes y habas	78
Nueces	77
Naranja, mango	37
Lechuga, escarola, espárrago	34
Tomate, maíz	26
Huevo de gallina	24
Harina de trigo, pan	22
Plátano, mandarina	21
Queso manchego	20
Sardinas, arenques	16
Alcachofas, calabacín	13

Fuente: González-González A.I, García Carballo M. M. Ácido fólico y defectos del tubo neural en Atención Primaria 2003; 13: 69-74.

Absorción y biodisponibilidad

Los F se presentan principalmente como poliglutamatos (Smulders & Stehouwer 2005). Antes de la absorción de F deben ser convertidos en la forma monoglutamato por la enzima conjugasa, que suele localizarse en la membrana del ribete en cepillo del yeyuno (Halsted 1990). Esta forma oxidada se degrada rápidamente en las condiciones en las que se presenta en el entorno gástrico postprandial. El ácido ascórbico, muy activo en el lumen gástrico, puede ser un factor crítico en la recuperación labil en el medio ácido reduciendo con ello la forma estable. Este mecanismo puede ser crucial en la optimización de la biodisponibilidad del folato (Lucock 2000). Una vez los poliglutamatos han sido hidrolizados y transformados en monoglutamatos son entonces transportados a través de la membrana del borde en cepillo por un mediador de transporte activo dependiente de energía, entonces son reducidos produciendo derivados tetrahidrofolatos que son metilados en las células de la mucosa antes de entrar en la circulación portal como 5-metil-tetrahidrofolato (Combs 2008)

Figura 2. Estructura química de tetrahidrofolato y varios de sus derivados. .



Fuente: Mark Lucock. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease processes. *Molecular Genetics & Metabolism* 2000; 71, 121–138

Sin embargo, el AF siempre está presente como monoglutamato. Lo que facilita su absorción y puede ser transportado a través del borde del cepillo intestinal sin tener que convertir su enzima.

Además de la forma en la que se presenta el F y AF, la conservación a temperatura ambiente y el cocinado prolongado de esta última dificultan la biodisponibilidad de F, provocando que se destruya hasta un 80% de su contenido (Winkels et al. 2007) . Por esta razón, la biodisponibilidad en humanos de AF es considerablemente mayor para el AF que para el F.

Metabolización

Esta vitamina es fundamental en dos de los principales ciclos de metabolización dentro de la célula, participando en la síntesis del ADN y suplementando a grupos metilos en las reacciones de metilación. En estos ciclos, el F o AF es sometido a una serie de cambios metabólicos, en los que la forma tetrahidrofolato, actúa como un donador y receptor de una unidad de carbono. Estas reacciones son comúnmente conocidas como el ciclo de un carbono dependiente de folato (Lucock 2000, Smulders & Stehouwer 2005)

El primero de estos ciclos está asociado con la producción de purinas y timidinas que son esenciales para la síntesis del ADN. En este ciclo el folato actúa como donador de una unidad de carbono. Durante periodos de rápida división y crecimiento celular tales como la infancia y el embarazo, el F o AF es crítico para el mantenimiento normal de la división celular.

El segundo se relaciona con el metabolismo de la homocisteína y la metionina. Homocisteína es un producto intermedio del metabolismo de la metionina y esta se metaboliza por dos vías: la remetilación, regenerado metionina, y la transulfuración, que convierte la homocisteína en cisteína. La vía de la metilación se compone a su vez de dos vías bioquímicas de intersección, una en la que participa 5-metil-tetrahidrofolato y vitamina B12 y otra en la que participa la betaína. La metionina puede ser a su vez utilizado para la síntesis de S adenosil metionina, que es el donante de grupos metilos, que es esencial para la metilación de los procesos metabólicos tales como: metilación del ADN, de proteínas, neurotransmisores y fosfolípidos. Debido al papel del AF o F en la remetilación de homocisteína a metionina, la deficiencia de folato puede contribuir a la metilación del ADN y la alteración de la acumulación de la homocisteína, esta última

asociada con enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas (Smulders & Stehouwer 2005, Daly et al. 2005)

Evaluación de la Ingesta de Folato. Métodos de Evaluación Dietética.

La dieta es una exposición compleja de medir por diversas razones. Por una parte, los distintos componentes que pueden ser de interés como por ejemplo los alimentos, nutrientes esenciales, principales fuentes de energía, aditivos, contaminantes químicos en la agricultura, toxinas de contaminación microbiológica, contaminantes inorgánicos, químicos utilizados para cocinar o procesar alimentos, toxinas naturales y otros componentes. Por otra parte, el período a evaluar que puede variar desde uno o varios días, a meses o años lo que puede complicar la evaluación. Por último, a diferencia de otras exposiciones, la dieta presenta una gran variabilidad entre personas, determinada en gran medida por dos de sus componentes principales, la **variabilidad interindividual**, debida a las propias diferencias existentes entre distintos individuos, y la **variabilidad intraindividual**, debida a la variación de una persona consigo misma (Willett 1998). En este sentido, en la mayoría de estudios epidemiológicos en los que se exploran relaciones entre la dieta y enfermedad, el interés se centra en evaluar la ingesta habitual a largo plazo y por ello conviene elegir un método de evaluación dietética que minimice la variabilidad intraindividual y evite en lo posible los errores de clasificación.

Existen distintos métodos de evaluación dietética, siendo los **métodos directos** basados en la recogida directa de información individual sobre el consumo de alimentos los más fiables y preferibles en estudios de nutrición y salud pública. Dentro de ellos hay distintas posibilidades, como los **Registro o diarios dietéticos** en los que se recoge la ingesta de alimentos prospectivamente (ej. 3 o 7 días), los **Recordatorio de 24 h.** en los que un entrevistador recoge con detalle los alimentos ingeridos en el día previo a la entrevista, y los denominados **Cuestionarios de Frecuencia de Alimentos (CFA)**, en los que se pregunta por la frecuencia de consumo habitual para un listado de alimentos durante un periodo de tiempo dado, y que suelen ser de tipo semi-cuantitativo (Willett 1998; Vioque 1991, Vioque 2006, Vioque 2007).

Tabla 1 Ventajas, limitaciones y utilidad de los principales métodos de evaluación de la ingesta dietética no invasivos

Métodos (referencia temporal)	Ventajas	Limitación	Utilidad
Registro Dietético (uno o varios días)	Gran precisión si se acompaña de pesada de alimentos. Datos prospectivos de la dieta	Laboriosidad, costo y posibles cambios en la dieta registrada	Buen método para validar otros métodos (ej. CFA) Uso limitado estudios clínicos-epidemiológicos
Recordatorio de 24 horas (un día)	Rápidos. Un solo contacto Válido para estimar ingestas medias de grupos.	No válido para clasificar individuos o grupos por su nivel de ingesta. Memoria episódica. Requieren entrevistador entrenado. Procesamiento costoso	Uso en encuestas de nutrición para estimar ingesta media grupal. Uso limitado para validar otros métodos. Repetidos pueden reducir variabilidad intraindividual
Cuestionario de Frecuencia Alimentaria (CFA) (un año)	Evalúa ingesta habitual en el pasado (memoria genérica). Rápido, fácil procesar. Bajo costo Bueno para clasificar dieta individuo/grupos	Necesidad de validar Validación costosa	Uso en encuestas y estudios epidemiológicos. El más recomendable en la mayoría de situaciones.

Fuente: Vioque J y Bolumar F. Nutrición y salud. En Hernández-Aguado I, Gil de Miguel A, Delgado Rodríguez M, Bolumar Montrull F. Manual de Epidemiología y Salud Pública 1ª Edición. Madrid, Editorial Médica Panamericana, 2005 (ISBN:84-7903-955-8) pp 119-122

Cuestionario de Frecuencia Alimentaria (CFA). Validez y Reproducibilidad

El CFA es el método de evaluación dietética más apropiado en la mayoría de situaciones cuando se quiere estudiar relaciones dieta-enfermedad. Son múltiples las razones para ello, desde su bajo coste, facilidad de procesamiento y su viabilidad para utilizar en estudios epidemiológicos de amplia base poblacional a la capacidad para evaluar la dieta habitual a largo plazo (Margetts BM 1997). Comparándolo con los Recordatorios de 24 horas (R24h), el CFA proporciona una mejor aproximación a la dieta habitual durante un largo periodo de tiempo, minimizando el efecto de la variabilidad intraindividual que tanto afecta a los R24h (Willett et al. 1985, Cade et al. 2002, Subar 2004). No obstante, antes de aceptar cualquier CFA como instrumento fiable para evaluar dieta, es necesario realizar una validación del mismo en la población donde se pretende utilizar, o al menos estar seguros de que se ha validado en una población de características similares (Margetts BM 1997, Willett 1998, Subar 2004).

Han sido muchos los estudios realizados para validar CFA en diferentes poblaciones y áreas geográficas del mundo (Willett 1998, Henríquez-Sánchez et al. 2009, Ortiz-Andrellucchi et al. 2009a, Ortiz-Andrellucchi et al. 2009b), empleándose para ello otros métodos de evaluación dietética como referencia (*gold estándar*) para comparar sus resultados. Las opciones más utilizadas a este respecto han sido los Registros Dietéticos (RD) o los Recordatorios de 24h, que se suelen realizar para un número de días relevantes dentro del periodo ventana por el que se pregunta en el CFA (Willett 1998, Cade et al. 2002) Más recientemente, se vienen utilizando como una opción alternativa o complementaria, algunos biomarcadores dietéticos (ej. Nivel plasmático de vitaminas) para comparar sus resultados con los obtenidos por el CFA.

En la validación de un CFA se miran dos aspectos fundamentales, su **reproducibilidad** o capacidad del CFA de obtener el mismo resultado cuando se repite su ejecución en la misma población, y su **validez**, o capacidad del CFA de medir lo que se pretende medir, es decir, la dieta verdadera y esto es imposible conocer con certeza aunque se asume que lo hace el método de evaluación dietética que se emplea como referencia (ej. RD, R24h o biomarcador dietético).

Dado que los métodos de evaluación dietética tradicionales suelen obviar la información referente a suplementos dietéticos, más utilizados en el embarazo por existir

recomendaciones específicas (Maats & Crowther 2002, Martínez-Frías et al. 2003, Daltveit et al. 2004), el uso de biomarcadores como referencia puede suponer una alternativa de gran valor cuando se realizan estudios de validación en el embarazo por la más que probable influencia de la suplementación. Una ventaja del uso de biomarcadores es que sus fuentes de errores en la medición son independientes de las relacionadas con las de la auto-notificación del CFA (Hunter 1998, Bingham 2002)

Los estudios de validación de CFAs son comunes en la literatura, sin embargo, en estudios con mujeres embarazadas son menos frecuentes, probablemente debido a las dificultades planteadas por los cambios dietéticos que pueden ocurrir durante el embarazo, el corto período disponible para evaluar la dieta y el reto que supone evaluar el uso de suplementos en el embarazo. Recientemente, se ha publicado una revisión sistemática de estudios de validación de distintos métodos de evaluación dietética para ingesta de micronutrientes y de alimentos en mujeres embarazadas en el que se revisaron un total de diecisiete estudios de validación (Ortiz-Andrellucchi et al. 2009a). Sin embargo, en ninguno de los estudios se incluía información sobre el uso de suplementos dietéticos y sólo en siete estudios se utilizaron biomarcadores como método de referencia para la validación (Anderson et al. 1988, Olsen et al. 1995, Rondó et al. 1999, Parra et al. 2002, Fawzi et al. 2004, Mikkelsen et al. 2006, Brantsaeter et al. 2008). Entre los estudios de validación realizados con embarazadas, el objetivo central en nueve de ellos fue el de validar la ingesta de folatos y en uno, la de ácido fólico (tabla 2):

Tabla 2 Estudios de validación de ingesta de folatos y ácido fólico medida por Cuestionarios de frecuencia Alimentaria en embarazadas.

Autor/año de publicación y país	Participantes	Método de estimación dietética	Método de Referencia	Correlaciones entre los métodos
<i>Ingesta de Folatos</i>				
Brantsaeter et al / 2007 /Noruega	119 embarazadas en 18-27 semanas de gestación	CFA en 4º mes gestación. Auto administrado	4 Registro dietéticos. Fólico sérico Fólico eritrocitario	Spearman: 0.32 Spearman: 0.26 Spearman :0.11
Mouratidou et al /2006/ UK	123 embarazadas en la semana 14-18 de gestación	CFA	2 Recordatorios 24 H	Pearson: 0.29

Baer et al /2005/ USA	Fase 1: 279 gestantes sem.12 ^a Fase 2: 242 gestantes sem. 28 ^a	CFA fase 1 CFA fase 2	6 Recordatorios de 24 H	Pearson fase 1- R24H: 0.25 Pearson fase 2- R24H: 0.26
Erkkola et al / 2001/ Finlandia	113 embarazadas	CFA	5 Registro dietético por pesada	Pearson: 0.32
Wei et al / 1999 / USA	101 embarazadas de bajos ingresos	CFA de las 4 últimas semanas	Recordatorios de 24H	Pearson :0.61
Robinson et al./ 1996 / UK	569 embarazadas en las 15 semanas de gestación	CFA Administrado por entrevistadores	4 Registro dietético por pesada	Spearman: 0.37
Brown et al. / 1996 / USA	56 embarazadas	CFA	4 Registro dietético por pesada	Spearman: 0.38:
Forsythe et al./1994 /USA	80 embarazadas	CFA Auto Administrado	3 Recordatorios 24 H	No lo específica
Greeley et al /1992 / USA	50 embarazadas en la semanas 16-21 de gestación	CFA	4 Recordatorios 24 H	Pearson: 0.39
Ácido Fólico				
Mikkelsen et al./ 2006 /Dinamarca	88 gestantes en las semanas 32-38	CFA	7 Registro dietético por pesada Fólico eritrocitario	Spearman dieta: 0.35 Spearman total (dieta+supl.): 0.53 Spearman total: 0.55

Fuente: Adaptado de Ortiz-Andrellucchi, A., Doreste-Alonso, J., Henríquez-Sánchez, P., Cetin, I. and Serra-Majem, L. (2009a) Dietary assessment methods for micronutrient intake in pregnant women: a systematic review. *Br J Nutr*, 102 Suppl 1, S64-86.

Como se aprecia en los datos disponibles reflejados en la tabla, salvo alguna excepción, se observan aceptables índices de reproducibilidad y validez de CFA para evaluar ingesta de F y AF cuando se compararon sus resultados con otros métodos de evaluación dietética como varios Registros o Recordatorios de 24 horas. Cuando se llevó a cabo la validación de los CFA utilizando como gold estándar biomarcadores como la concentración de fólico sérico o eritrocitario, los coeficientes fueron más bajos aunque también satisfactorios y significativos. Por tanto y a pesar de la aun escasa evidencia existente, la evidencia actual hace pensar que el CFA es un método apropiado para evaluar ingesta de nutrientes relevantes en embarazo como la de folatos y ácido fólico.

Ingesta de Folato y Ácido Fólico y su Relación con la Salud.

Durante los últimos 20 años, la ingesta de F y AF ha sido un tema de interés y atractivo para muchos científicos y para la salud pública debido al papel preventivo de este en la prevención de defectos del tubo neural (DTN) (MRC Vitamin Study Research Group 1991, Czeizel & Dudás 1992, Czeizel & Dudás 1994a, Czeizel & Dudás 1994b). Posteriormente, el interés por esta vitamina se centró en examinar el papel beneficioso que podía jugar en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares debido a su potencial papel antiaterogénico (Perry et al. 1995, Petri et al. 1996). Y más recientemente, han surgido nuevas hipótesis, como la influencia de F y AF, y/o de la variación alélicas en los genes que codifican las enzimas dependientes de folato en el desarrollo de varios desordenes como los relacionados con la salud reproductiva y el resultado de embarazo (Scholl & Johnson 2000, Tamura & Picciano 2006, Goh & Koren 2008), varios cánceres (cervix, colon, pulmón y mama) (Zhang et al. 1999, Xu & Chen 2009), Alzheimer (Chen et al. 2010), autismo (Main et al. 2010) y desordenes afectivos. Aunque para muchas de estas relaciones no hay una evidencia clara y sigue habiendo mucha controversia en la relación al papel preventivo para estos procesos del F y AF.

Enfermedades Vasculares

Son numerosos los estudios que indican que los niveles moderadamente elevados de homocisteína en sangre aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Boushey et al. 1995, Refsum et al. 1998, Gerhard & Duell 1999). Sin embargo, el mecanismo por el cual la homocisteína aumenta el riesgo de enfermedad vascular sigue siendo objeto de una gran cantidad de trabajos de investigación.

Entre las vitaminas que regulan los niveles de homocisteína esta el AF o F. Por lo tanto, algunos estudios han investigado la posible influencia que pueden ejercer las dietas ricas en este nutriente en la prevención de las enfermedad cardiovascular (Voutilainen et al. 2001, Collaboration 2005). Pero, pese a lo que cabría esperar, en la actualidad no está claro si el incremento de la ingesta de F y/o AF es el responsable de un menor riesgo de enfermedad cardiovascular. En los últimos años se han llevado a cabo varios ensayos clínicos controlados con placebo para determinar si el uso de suplementos de AF y otras vitaminas B reducen la homocisteína y por tanto la incidencia de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo un meta-análisis llevado a cabo en 2007, que incluía a 14.000 sujetos, mostró que los suplementos de vitamina B no tuvieron ningún efecto

significativo en el riesgo de enfermedad coronaria o accidente cerebrovascular (Clarke et al. 2007). Del mismo modo, otro meta-análisis de 12 ensayos clínicos, incluyendo información de 16.958 individuos con enfermedad cardiovascular preexistente o renal, halló que los suplementos de AF no tuvieron ningún efecto sobre la enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular o muerte por cualquier causa, a pesar reobservarse reducciones en las concentraciones plasmáticas que variaron entre un 13% y 52% (Bazzano et al. 2006).

Cáncer

En los últimos años nuevos aspectos de la genética del cáncer, como la metilación del ADN y los microARNs, están siendo estudiados como importantes factores a tener en cuenta por su implicación en el desarrollo de células cancerígenas. Debido a las importantes funciones desempeñadas por el F en la síntesis y metilación ADN y ARN, es posible que la ingesta de este nutriente pueda afectar tanto a la reparación del ADN y la expresión genética (Choi & Mason 2000).

Varios estudios epidemiológicos, han observado que una disminución de los niveles de F se asocia con mayor riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino, colon, recto, pulmón, cerebro, páncreas y mama sobre todo en estudios con animales. Entre estos, la evidencia científica más consistente se observa para el cáncer de colorrectal (Cravo et al. 1998, Choi & Mason 2000, Xu & Chen 2009) y el cáncer de mama (Xu & Chen 2009).

Cáncer Colorrectal

En 2005 fue publicado un metanálisis de siete estudios de cohortes y nueve estudios de casos y controles en el cual se concluía una asociación inversa entre la ingesta de F y el riesgo de cáncer colorrectal, sin embargo, la ingesta de F más AF no se asoció con el riesgo de cáncer colorrectal (Sanjoaquin et al. 2005). Es importante señalar que en los estudios de casos y controles, los autores afirman que podría existir una posible interacción entre la ingesta de F y la ingesta de otros nutrientes (fibra dietética, vitaminas,...), de ahí la complejidad de las interacciones entre genética y nutrición.

Cáncer Mama

Los estudios que relacionan la ingesta de F y el riesgo de tener cáncer de mama son inconsistentes y contradictorios (Kim 2006). Sin embargo, algunos estudios prospectivos sugieren que la ingesta de AF puede reducir el riesgo de cáncer de mama en mujeres que consumen regularmente alcohol (≥ 1 bebida alcohólica por día) (Rohan et al. 2000, Sellers et al. 2001, Sellers et al. 2002, Xu & Chen 2009).

Alzheimer y Deterioro Cognitivo

El papel del F en la síntesis de los ácidos nucleicos y las reacciones de metilación es esencial para el buen funcionamiento del cerebro. Durante la última década, varios investigadores han descrito la asociación entre la disminución de los niveles de F y el deterioro cognitivo en ancianos, aunque en muchas ocasiones es difícil probar si el efecto encontrado es debido a la ingesta de este nutriente o a la combinación de varios nutrientes (Nelson et al. 2009, Kronenberg et al. 2009, Smach 2011). En 2008, un Estudio Cooperativo de Alzheimer en Estados Unidos llevó a cabo un ensayo clínico a doble ciego controlado con altas dosis de folato en 340 participantes con nivel leve o moderado de Alzheimer (202 en el grupo de tratamiento y 138 en el grupo placebo). Aunque la suplementación fue eficaz en la reducción de los niveles de homocisteína en el grupo de tratamiento frente al placebo no tuvo ningún efecto beneficiosos en la medida cognitiva (Aisen et al. 2008).

Salud reproductiva

Las primeras investigaciones sobre la importancia del F y AF en la salud reproductiva se remontan a 1964, cuando Bran Hibbard publicó una investigación llevada a cabo en Liverpool con 1484 mujeres embarazadas de bajos ingresos. (HIBBARD 1964). En ella, mostró como una excreción anormal de ácido forminoglutamato (FIGLU) no estaba solo relacionada con anemia megaloblástica, sino también con el aborto espontáneo o el desprendimiento de la placenta. Del mismo modo, este estudio demostró que una excreción anormal de FIGLU estaba relacionada con efectos adversos del embarazo previo como bajo peso, malformaciones congénitas y mortalidad perinatal. Estos hallazgos llevaron a Hibbard a establecer como hipótesis que el incremento de efectos adversos en el embarazo en algunos casos reflejaba el pobre estado de folato debido a varios factores relacionados

con problemas de demanda y suplementación durante el embarazo, una menor absorción y una defectiva utilización del folato debido a ciertas drogas (Hibbard & Hibbard 1971)

Defectos en el tubo neural (DTN)

Los DTN se generan por lo general en etapas tempranas del desarrollo fetal, es decir entre 28-30 días después de la concepción. Los DTN tienen lugar primordialmente a dos niveles: en el cerebro y en la columna vertebral. Los tipos más comunes son:

■ ***Espina bífida (columna vertebral)***: La espina dorsal no está completamente cerrada. Esta malformación puede originar una lesión permanente en la médula espinal y en los nervios espinales con parálisis y/o pérdida del control de los esfínteres en la vida adulta.

■ ***Anencefalia (cerebro)***: El cráneo y el cerebro no están completamente desarrollados. La abertura frecuentemente no está cubierta de huesos y piel. Esta malformación es incompatible con la vida.

■ ***Encefalocele o herniación del cerebro y/o meninges (cerebro)***. El cráneo no está completamente cerrado. Y partes del cerebro pueden pasar a través de las aberturas del cráneo. La vida dependerá del tamaño de la malformación.

Los DTN son la segunda causa de muerte en recién nacidos por detrás de los defectos congénitos del corazón (Fleming 2001). La prevalencia de DTN presenta una gran variabilidad según la región y la raza, y parece haber disminuido en las últimas décadas. En la Unión Europea, DTNs afectan al menos del 4500 embarazadas cada año (Busby et al. 2005). En España la prevalencia de DTN es una de las más bajas de Europa, en el período 1990-2004 se registraron 9-12 casos por 10.000 nacimientos (García López et al. 2009).

Desde que Hibbard planteó la hipótesis sobre la relación de estado de Fo AF y malformaciones congénitas fueron numerosos los estudios planteados para corroborar esta hipótesis. Pero no sería hasta 1991 cuando la hipótesis se confirmaría fruto del ensayo clínico del Medical Research Council Vitamin Study Group (MRC Vitamin Study Research Group 1991). El objetivo de este ensayo fue evaluar la eficacia de tomar 4 mg de AF desde un mes antes de la concepción hasta el primer trimestre de embarazo para prevenir la recurrencia de DTN en mujeres que en embarazos previos habían tenido un hijo con DTN. Este estudio se llevó a cabo en 7 ciudades y contó con 1817 embarazadas y

en él se demostró que la suplementación con AF reducía en un 72% la recurrencia de este defecto

Desde la aparición de este estudio y otros trabajos posteriores que mostraron un efecto beneficioso del AF, se ha generalizado la recomendación de seguir una dieta variada y rica en F junto al aporte periconcepcional de 400µg por día de suplementos de AF para reducir el riesgo DTN y otras malformaciones fetales en mujeres sin antecedentes previos y 4mg en mujeres con antecedentes previos de esta malformación (Czeizel & Dudás 1992, Eichholzer et al. 2006, Cuervo et al. 2009). Además de esta recomendación recientemente se ha propuesto la ingesta recomendada (IR) de 600µg por día, considerando el aporte de dieta y suplementos para satisfacer las necesidades materno-fetales de F y se ha extendido a todo el embarazo. Asimismo, el Instituto de Medicina de EEUU, ha establecido recientemente el denominado límite superior tolerable de ingesta de AF en 1000µg por día como el nivel máximo de ingesta diaria de AF que probablemente no comportaría riesgo de efectos adversos en gente sana y en concreto para asegurar que el riesgo de anemia macrocítica debida a un posible déficit de vitamina B12 no pasara desapercibida por un exceso de AF (Institute of Medicine 1998). Aunque hasta la fecha no se ha demostrado toxicidad o efectos adversos por exceso (Eichholzer et al. 2006), se está llamando últimamente la atención sobre un posible efecto indeseado de usar dosis superiores a las recomendadas (Lucock 2004); recientemente se ha notificado una mayor mortalidad por cáncer y total entre los participantes del seguimiento de 2 ensayos clínicos que tomaron suplementos e 0.8 mg por día durante casi 7 años (Ebbing *et al.* 2009).

Pese a los esfuerzos realizados en los últimos años para descubrir el mecanismo por el cual el AF previene los DTN, a día de hoy sigue siendo una incógnita por resolver, ya que hasta la fecha no ha sido posible. Estas investigaciones han tratado de dar respuesta centrándose en la absorción de folato (Bower 1993, Boddie 2000), metabolismo anormal de un carbono (Habibzadeh 1993) y el metabolismo de la homocisteína (Stegers-Theunissen 1991, Mills 1995, Bjørke-Monsen 1997, Taparia 2007).

Por ello, resulta de interés vigilar la ingesta de AF en el embarazo, ya que han sido pocos los estudios que han descrito la ingesta de F y AF durante todo el embarazo así como el incumplimiento de las recomendaciones y los factores que se asocian con este incumplimiento. Estudios europeos (Hassapidou 2000, Mouratidou 2006, Arkkola 2006, Pinto 2009, Roza 2009) que evalúan la ingesta de F muestran como la ingesta media de F

oscila entre 200-300 µg/día, y el porcentaje de suplementación en preconcepción se sitúa alrededor del 20%, estos hechos ponen de manifiesto un alto porcentaje de mujeres que incumplen las recomendaciones. En España (Irlles Rocamora 2003, Arija 2004, Mariscal-Arcas 2009, Ortiz-Andrellucchi 2009) se presenta una situación similar al contexto europeo, con excepción de un estudio (Cárcel 2005) que presenta un ingesta de F ligeramente superior.

Desprendimiento de la placenta.

Los primero estudios que relacionan la ingesta de F y el desprendimiento placentario fueron inconsistentes mientras algunos de ellos mostraron un incremento del riesgo placentario (Hibbard 1963, Hibbard 1964, Steriff 1967, Hibbard 1969), otros no encontraron asociación (Menon 1966, Henry 1968, Whalley 1969, Daniel 1971, Hall 1972, Pritchard 1991).

Posteriormente, entre los años 1990 y 2000, se publicaron algunos estudios observacionales que mostraban una asociación consistente entre la hiperhomocisteína y el aumento del desprendimiento placentario (Stegger-Theunissen 1992, Goddijn-Wessel 1996, Owen 1997, Ray 1999, Vollset 2000). Sin embargo, en muchas ocasiones el análisis de la homocisteína fue posterior al desprendimiento placentario, por lo que la asociación no puede ser corroborada (Tamura 2006). De hecho Stegger-Theunissen y colegas mostraron que esta asociación perdía la significación estadística tras ajustar por el tiempo (Stegger-Theunissen 2004). Más recientemente, algunos estudios han explorado la posible asociación entre el desprendimiento placentario y algunos polimorfismos genéticos maternos que participan en el metabolismo del folato, incluido el MTHFR (van der Molen 2000, Nurk 2004, Parler-McDermott 2005, Jaaskelainen 2006, Ananth 2007, Ananth 2008). Sin embargo, estos resultados también son inconsistentes. Hecho que demuestra la dificultad para establecer una clara asociación entre la ingesta de folato y el desprendimiento.

Preeclampsia

Una revisión publicada en 2006 por Tamura (Tamura, 2006), mostraba como de los más de 30 estudios revisados, 11 incluyeron los valores de homocisteína plasmática y folato (Rajkovic 1997, Powers 1998, Laivuori 1999, Hogg BB 2000, Cotter 2001, Sanchez 2001, Cotter 2003, López-Quesada 2003, Powers 2003, Patrick, 2004, Vanderjagt 2004,

Vadachkoria 2004). La mayoría indicaban como las concentraciones plasmáticas de folato eran similares entre las mujeres con y sin preeclampsia y no existía una relación directa entre la deficiencia de folatos y la aparición de preeclampsia. Una de las hipótesis que justifica este hallazgo es el hecho de que la hipermocisteína puede ser un sustituto de algún evento metabólico que responde a la preeclampsia. En el año 2002 se presentó los resultados de un estudio que comparaba las tasas de preeclampsia antes (1990-1997) y después (1998-2000) la fortificación con ácido fólico en Canadá (Ray 2002). Este estudio reveló que no hubo un aumento en el riesgo de preeclampsia entre antes y después de la fortificación.

Otra de las posibles hipótesis en el que la evidencia científica ha estado trabajando en los últimos años es que la variante de la MTHFR 677TT materna se asocie con un mayor riesgo de preeclampsia (van de Molen 2000, Murakami 2001, D'Aniello 2003, Powers 1999, Kupfermanc 1999, Kaiser 2000, Prasmusinto 2002, Pérez-Mutul 2004, Vefring 2004, Pegoraro 2004, Williams 2004) con homocisteína elevada cuando el nivel de folato es pobre (Jacques 1996). Estos estudios no se asociaron significativamente con el riesgo de preeclampsia. La patogénesis de la preeclampsia es sin duda compleja, y los datos disponibles no permiten MTHFR ser incluido o excluido como factores causales, los estudios futuros deben controlar los factores ambientales y nutricionales

Aborto espontáneo y muerte fetal.

Las causas de aborto espontáneo o muerte fetal se consideran multifactoriales y son a menudo poco claras.

Las investigaciones que relacionan el aborto espontáneo o muerte fetal con el folato se centran en la relación con las concentraciones plasmáticas bajas, con la homocisteína y con las variantes genéticas. Los hallazgos entre la posible relación entre las concentraciones plasmáticas de folato y el riesgo de aborto espontáneo y muerte fetal no son concluyentes. Mientras hay estudios que concluyen que hay un menor riesgo de aborto espontáneo o de muerte fetal entre las mujeres con una deficiencia de folatos (Ainley 1961, Martin 1965, Giles 1966, Gindler 2001), otros estudios no encuentran asociación (Varadi 1966, Chanarin 1968, Czeizel 1994b, Berry 1999, Nelen 2000a, Ronnenberg 2002, de Weerd 2003).

Los estudios sobre la relación entre la homocisteína plasmática elevada con un mayor riesgo de aborto espontáneo son más concluyentes (Steeegers-Theunissen 1992, Wouters 1993, Nelen 1998, Quere 1998, Nelen 2000b). No es así para la relación con las muertes fetales, en un estudio realizado en Noruega con mujeres con antecedentes de muerte fetal se encontró que las mujeres que estaban en el cuartil más alto de homocisteína tenían un mayor riesgo de muerte fetal. Sin embargo, el análisis de la homocisteína en este estudio se hizo a mayores de 25 años y después del embarazo.

La asociación entre el riesgo de aborto o muerte fetal y polimorfismos maternos no son concluyentes. La mayoría de estudios que investigaron la relación entre polimorfismos maternos MTHFR y aborto espontáneo mostraron un aumento del riesgo de aborto espontáneo (Nelen 1998, Kutteh 1999, Isotalo 2000, Martinell 2000, Foka 2000, Unfried 2002, Zetterberg 2003) a excepción de dos investigaciones (Nelen 1998, Foka 2000), que sugerían que las variantes de la MTHFR por sí solas no aumentan el riesgo de aborto espontáneo.

Sólo unos pocos estudios analizaron el riesgo de muerte fetal y polimorfismos de MTHFR, y los resultados son equívocos (Alfirevic 2001, Nurk 2004, Hefler 2004). Se necesitan estudios adicionales para aclarar si esta asociación existe.

Otras asociaciones entre el déficit de folatos y complicaciones del embarazo han sido estudiados como por ejemplo las relaciones entre concentraciones plasmáticas de folato bajas, elevadas homocisteína o variantes de los genes relacionados y amenaza de aborto (Martin 1964), sangrado vaginal (Martin 1964, Steriff 1967, Daniel 1971, Neiger 1993), el infarto de placenta (Goddijn 1996, van der Molen 2000), o la ruptura prematura de la membrana (Ferguson 2002, Knudtson 2004). Los hallazgos de estos estudios no nos han permitido hacer conclusiones claras y concisas acerca de estas asociaciones debido a los pocos estudios realizados y es necesaria más investigación adicional.

Neurodesarrollo

El retraso mental es una de las características clínicas más relacionadas con el metabolismo del AF, a pesar de que el mecanismo por el cual se produce esta alteración es desconocido (Rosenblatt 2001). Los estudios sobre las consecuencias de la situación inadecuada de folato en el embarazo y el desarrollo neurológico de los niños son escasos, a pesar de la evidencia científica en ensayos animales que prueban que la deficiencia de

folato es perjudicial para el desarrollo neurológico (Whitley 1951, Gospe 1995, Craciunescu 2004, Ferguson 2005). Algunos de los estudios que han evaluado esta hipótesis en humanos, han mostrado resultados contradictorios (Gross 1974, Tamura 2005). De hecho un reciente artículo publicado por la cohorte INMA-Menorca informó que el consumo de suplementos de ácido fólico en preconcepción se asoció con un mejor desarrollo neurológico en los niños a los 4 años de edad (Julvez 2009). Las diferencias encontradas en los hallazgos pueden deberse a diferencias en el grado de deficiencia de folato en la madre, la edad de los niños en la evaluación, y la sensibilidad y la especificidad de los instrumentos de evaluación utilizados

Peso y talla al nacimiento

Hibbard demostró que las concentraciones plasmáticas de folato en etapas tempranas del embarazo se asociaron con el tamaño del niño al nacimiento. Esta asociación se encontró principalmente para edad gestacional (*small for gestational age*, SGA) y extendida para prétermino. Él encontró que aquellas mujeres que habían tomado suplementos de AF, aunque hubiese sido por un corto período de tiempo, tenían mayores concentraciones plasmáticas de folato frente a los que no habían tomado suplementos de AF (Hibbard 1975)

Desde entonces, ha habido un interés creciente en los posibles efectos de AF durante el embarazo sobre el riesgo de peso al nacimiento: bajo peso al nacimiento (<2500 gramos), prétermino (<37 semanas) o SGA. En una revisión publicada en 2006 se identificaron 12 ensayos que evaluaban los efectos de AF sobre el peso al nacimiento. En 7 de ellos, la suplementación incrementaba el peso al nacimiento (tabla 2). En el resto no se encontró efecto, probablemente debido a un suficiente estado materno de folato antes del embarazo y al tiempo de suplementación. Una posible justificación de las discrepancias observadas se puede deber a la raza, el peso y la talla de la madre, el estado de folato inicial de la madre, factores socioeconómicos y hábitos dietéticos, incluyendo la ingesta de folato y otros nutrientes.

Tabla 3. Ensayos para evaluar el efecto del AF en el bajo peso

Study	Folic acid dose	Subjects	Start of supplementation	Difference in birth weight ¹
	<i>mg/d</i>	<i>n</i>	<i>wk of gestation</i>	<i>g</i>
Baumslag et al, South Africa (223)	5.0	128	28	330
Giles et al, Australia (224)	5.0	620	≈10–30	None
Iyengar, India (225)	0.3	49	20–24	300 ¹
Fletcher et al, United Kingdom (226)	5.0	643	14	None
Fleming et al, Australia (227)	0.5	89	20	None
Iyengar et al, India (228)	0.2–0.5	189	24–26	200 ¹
Rolschau et al, Denmark (229)	5.0	36	21–25	407 ¹
Blot et al, France (230)	0.35	109	≈28	158 ¹
Tchernia et al, France (231)	0.35	108	≈24	157
Agarwal et al, India (232)	0.5	260	16–24	290
Czeizel et al, Hungary (187)	0.8	4672	Before conception (to 12 wk only)	None
Rolschau et al, Denmark (233)	1.0 or 2.5	3805	Before conception	≈40

¹ A significant ($P < 0.05$) difference between the supplemented and nonsupplemented groups was reported.

T

Fuente: Tamura T, Picciano M. Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr* 2006;83(5):993-1016.

Un número importante de estudios observacionales han examinado también la relación entre el uso de suplementos que contenían AF en el embarazo, la ingesta de F y concentraciones plasmática de F materno, y el bajo peso al nacer, nacimiento pretérmino y SGA. Mientras en unos estudios se muestra que el la suplementación con AF se asocia con un incremento del crecimiento fetal y un menor riesgo de bajo peso y pequeño para edad gestacional para peso (Scholl et al. 1996, Scholl et al. 1997, Neggers et al. 1997, Siega-Riz et al. 2004, Lindblad et al. 2005, Relton et al. 2005, Catov et al. 2007, Timmermans et al. 2009), en otros no existe asociación (Hogg et al. 2000, Ronnenberg et al. 2002, Takimoto et al. 2007, Watanabe et al. 2008) observándose globalmente una falta de consistencia entre ellos que puede deberse a distintas razones como problemas metodológicos, un pequeño tamaño muestral, la falta de control de factores de confusión y el tiempo de exposición del F y AF, lo que en definitiva imposibilita hasta ahora extraer conclusiones firmes sobre si la suplementación con FA influye en el bajo peso al nacimiento, nacimiento pretérmino o SGA.

JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos 20 años, una de las contribuciones más importantes desde la nutrición a la salud pública ha sido el descubrimiento y aplicación del efecto preventivo de una ingesta adecuada de F y AF en la prevención de los DTN a pesar incluso de desconocerse los mecanismos por los cuales se ejerce este efecto preventivo. En todo caso, ello no ha impedido que la prevención basada en el cumplimiento de las recomendaciones dietéticas respecto a F y en el uso de suplementos de AF periconcepcionalmente se haya promocionado y en la actualidad nadie discute su importancia. En España, han sido pocos los estudios que han descrito la ingesta de F y AF a lo largo de todo el embarazo, diferenciando la procedente de la dieta y la de suplementos (Martínez-Frías 2003). Esta falta de información, junto a la aparición de hipótesis recientes sobre una posible influencia de la ingesta de F y AF en el retardo del crecimiento fetal y en el bajo peso al nacer, ha justificado el desarrollo de este trabajo de investigación.

El Proyecto INMA (Infancia y Medio Ambiente), estudio de cohortes prospectivo de madres-hijos que se desarrolla en varias regiones españolas, incluida la Comunidad Valenciana, es por lo que sabemos el único que estudia la influencia de factores prenatales sobre el desarrollo fetal, el nacimiento y el posterior desarrollo de los niños en España, aunque a nivel mundial existen otros como R Generation, ALSPALC, Proyecto Viva, Moba entre otros. Dentro de este estudio hemos desarrollado y validado un Cuestionario de Frecuencia Alimentaria (CFA) para evaluar la ingesta dietética durante el embarazo, incluido el uso de suplementos, lo que ha permitido estimar la ingesta de F y AF durante el embarazo, y analizar su efecto sobre variables antropométricas y otras medidas al nacimiento, objeto central de esta tesis.

CONTEXTO

La motivación de esta tesis surgió por el insuficiente conocimiento científico actual sobre el efecto de F y AF durante todo el embarazo en relación al desarrollo fetal y el recién nacido, y el Proyecto INMA-Valencia, por su singularidad, ha brindado el contexto perfecto para ello, al ser un estudio prospectivo de cohorte de madres-hijos cuyas características se detallan en el apartado de Metodología General y en los propios artículos.



Las hipótesis que nos hemos propuesto verificar en esta tesis doctoral guardan estrecha relación con los objetivos planteados. En este sentido, tratamos de verificar:

1. La sospecha de una alta proporción de mujeres con un ingesta dietética por debajo de 600 $\mu\text{g/d}$ de F durante todo el embarazo y con ingesta inferior a 400 $\mu\text{g/d}$ desde la preconcepción hasta el 3^o mes de embarazo de ingesta de suplementos de AF.
2. La constatación de un mantenimiento inadecuado del uso de suplementos de AF durante todo el embarazo, especialmente fuera del periodo recomendado (periconcepcional).
3. Los hijos de madres con ingesta inadecuada de AF (dieta y/o suplementos) en la etapa periconcepcional, tanto por defecto como por exceso, presentaban un mayor riesgo de tener un crecimiento fetal inadecuado medido por un peso/talla pequeño para la edad gestacional (SGA).

Una última hipótesis conceptual y necesaria para lograr las anteriores se refería al instrumento de medición empleado para estimar la ingesta dietética de F y AF, el Cuestionario de Frecuencia Alimentaria (CFA). Por ello, también verificamos si:

4. El CFA era un instrumento suficientemente reproducible (capacidad del CFA de obtener el mismo resultado cuando se repite su ejecución en la misma población en dos momentos diferentes), y válido (capacidad del CFA de medir lo que se pretende medir) para evaluar ingesta de F y AF procedente de la dieta y del uso de suplementos.



En correspondencia con las hipótesis planteadas, los objetivos de la Tesis Doctoral que se han alcanzado con la publicación de los artículos presentados han sido:

En relación al Artículo 1

1. Estimar la ingesta de F y AF procedente de la dieta y del uso de suplementos durante todo el embarazo en gestantes de la cohorte INMA-Valencia (2004-2006)
2. Estimar el grado de cumplimiento de las recomendaciones para F y AF de la dieta y de suplementos durante el embarazo.
 - 2.1. Explorar los factores asociados al no cumplimiento de la recomendación de 400 µg/día de suplementos AF en la etapa periconcepcional para prevenir los defectos del tubo neural.
 - 2.2. Explorar los factores asociados al no cumplimiento de la ingesta recomendada (IR) de ingesta total de AF (Dieta más Suplementos) durante todo el embarazo para cubrir las necesidades materno-fetales.

En relación al artículo 2

3. Examinar la relación entre la ingesta de F y AF de la dieta y de suplementos en la etapa periconcepcional y el riesgo de tener un recién nacido pequeño para la edad gestacional para peso (SGA-P) y talla (SGA-T).

En relación al ANEXO I

4. Analizar la reproducibilidad y validez de un CFA utilizado para evaluar la ingesta de F y AF procedente de la dieta teniendo en cuenta el uso de suplementos.



Población:

El proyecto INMA “Infancia y Medio Ambiente” es un estudio epidemiológico de cohorte prospectivo, multicéntrico y multipropósito que se desarrolla en España con el objetivo general de investigar el papel de los contaminantes ambientales y de la dieta sobre el crecimiento y desarrollo fetal y del niño. El estudio INMA se compone de 7 cohortes (Figura 3), tres de las cuales existían previamente antes de la configuración definitiva de la red INMA en 2003 (Ribera de l’Ebre, Menorca y Granada) que se completa con la creación de cuatro cohortes nuevas con un protocolo de estudio común (Asturias, Guipúzcoa, Sabadell y Valencia).

Figura 3. Localización geográfica de las siete áreas de estudio del Proyecto INMA distinguiendo entre las cohortes de novo y las cohortes preexistentes



Esta tesis doctoral se centra en la explotación de los datos de la Cohorte INMA-Valencia. Entre febrero de 2004 y junio de 2005, se llevó a cabo el reclutamiento de

nuestra población de estudio en las área sanitaria 5 y 6 de Valencia por las comadronas y obstetras que daban a las participantes información oral sobre el estudio. A las embarazadas que acudieron en la semana 12 al programa de prevención poblacional de cribado de malformaciones congénitas y síndrome de Down llevado a cabo en el Hospital la Fe de Valencia en el primer trimestre de embarazo, se les hizo entrega de un paquete informativo sobre el estudio, y se solicitaba su consentimiento informado.



Siempre y cuando cumplieran los criterios de inclusión, éstas serían incluidas en el estudio. Estos criterios son:

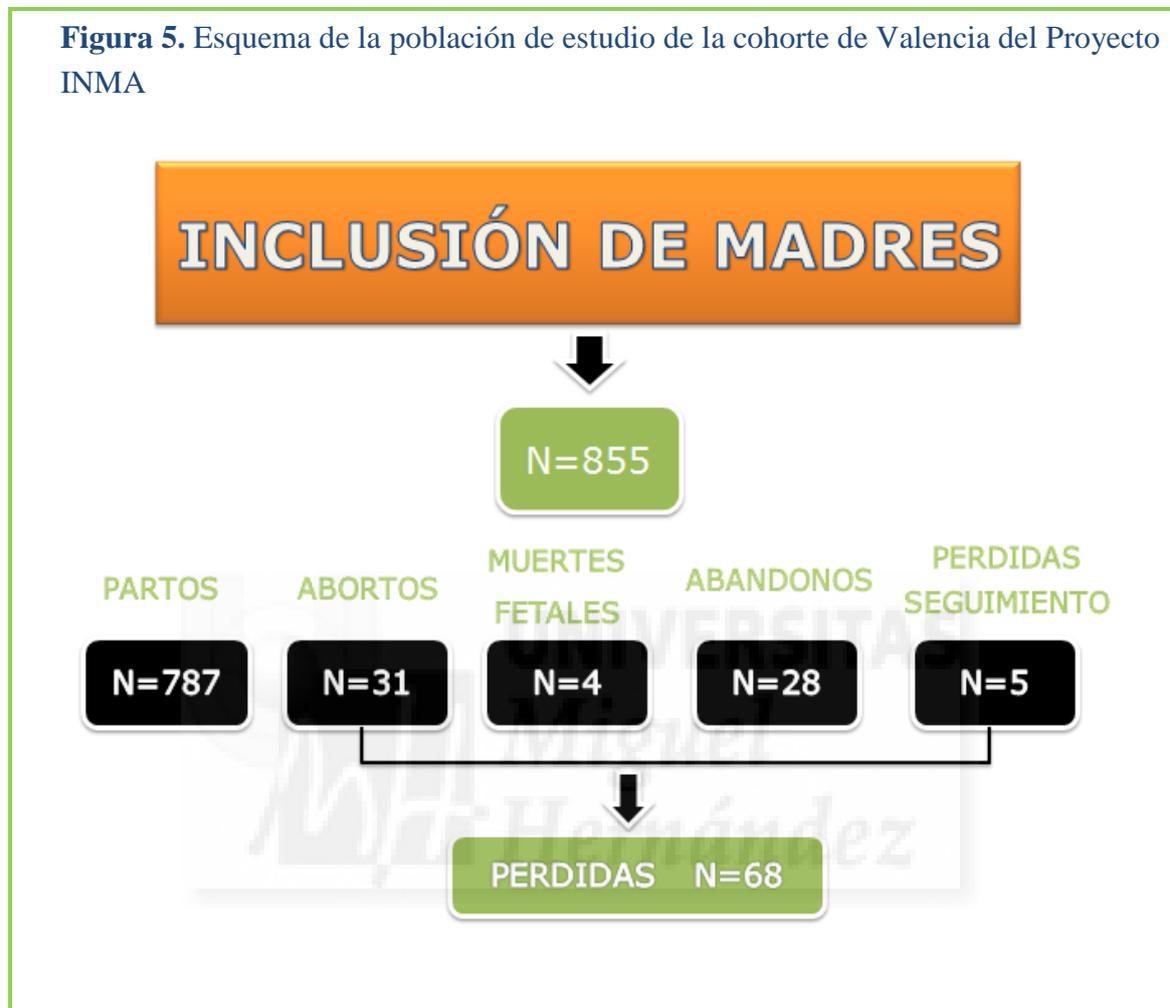
- Residente en el área de estudio
- Tener un mínimo de 16 años de edad
- Tener un embarazo único.
- Realizar su primera visita prenatal en el hospital público o centro de salud del área
- No haber seguido ningún programa de reproducción asistida,
- Dar a luz en el hospital de referencia y
- No tener problemas de comunicación.

Las mujeres embarazadas que aceptaron participar firmaron un formulario de consentimiento informado.

De las 1563 mujeres inicialmente elegibles, 840 mujeres aceptaron participar (tasa de aceptación: 54%). 15 mujeres más que habían participado en 2003 en un estudio piloto también fueron incluidas. Entre la inclusión del estudio y el parto 68 sufrieron algún

evento y no puedo continuar en el estudio (Figura 5). Finalmente entre mayo 2004 y febrero del 2006 se incluyeron en el estudio 787 recién nacidos vivos de las mujeres participantes.

Figura 5. Esquema de la población de estudio de la cohorte de Valencia del Proyecto INMA



Variables de estudio:

La información de las variables de estudio se recogió mediante entrevistas personalizadas realizadas por entrevistadores entrenados, así como mediante exploraciones y revisión de registros clínicos. Se realizaron dos entrevistas desde el momento de inclusión hasta el nacimiento, una en el momento de inclusión alrededor de las 10-13 semanas de gestación cuando la mujer acudía por primera vez y/o se concretaba la primera cita, y otra segunda entre las semanas 28-32 gestación. El momento de la recogida de información de las variables que se han utilizado en esta tesis se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Recogida de información en la Cohorte de Valencia del Proyecto INMA

	1 ^{er} Trimestre de Gestación	3 ^{er} Trimestre de Gestación	Nacimiento
Cuestionarios	General. Factores sociodemográficos, obstétricos, clínicos y estilos de vida Cuestionario de Frecuencia de Alimentos Preguntas sobre Suplementación	Estilos de vida (tabaquismo) Cuestionario de Frecuencia de Alimentos Preguntas sobre Suplementación	
Exploraciones			Antropometría al nacimiento. Peso y Talla
Marcadores Biológicos	Concentraciones Plasmáticas		
Registro Hospitalario	Antecedentes de partos previos.	Peso de la mujer durante 2 trimestres.	Historia de parto

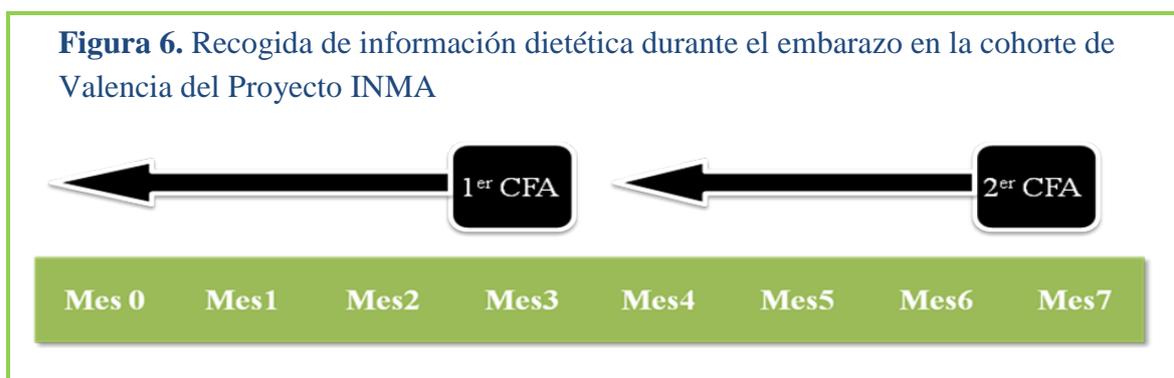
Ingesta dietética de Folato (F)

La ingesta de folato se evaluó mediante un cuestionario semi-cuantitativo de frecuencia alimentaria (CFA) de 100 ítems (anexo IV), similar al utilizado por Willett en el estudio de las Enfermeras Norteamericanas (Willett et al. 1985). Este CFA fue adaptado y validado para utilizarlo en población adulta española (Vioque & Gonzalez 1991, Vioque 2006, Vioque *et al.* 2007), y como parte de esta tesis fue posteriormente actualizado y adaptado para incluir la ingesta que era de interés para los propósitos del estudio como la ingesta de folatos y otros nutrientes (ej. vitaminas antioxidantes, ingesta de ácidos grasos). Por ello, nos propusimos su validación atendiendo a las circunstancias de la población (mujeres embarazadas) y del propio estudio. El CFA recoge 9 frecuencias de consumo para cada ítem que van desde “nunca o menos de una vez al mes” hasta “seis o más veces por día”. El tamaño de las raciones estaba preestablecido en un número importante de ítems

(ej. Yogurt, 125 g) y para aquellos ítems en los que no estaba preestablecido se utilizaron raciones estándar de uso común en España (Willett et al. 1985, Vioque & Gonzalez 1991, Vioque *et al.* 2007, Vioque 2006, Palma I 2008, Willett 1998)

La composición nutricional de los alimentos se obtuvo principalmente de las tablas de composición de alimentos norteamericanas y se complementó con otras fuentes relevantes de ámbito internacional y nacional para adaptarlas a la realidad española (US , US Department of Agriculture 2011, Palma I 2008, O'Neill et al. 2001) Para calcular la ingesta de nutrientes transformamos la frecuencia de consumo en gramos por día de cada alimento, multiplicamos ésta por la composición nutricional y, por último, dividimos el resultado por el tamaño de las raciones (ver anexo V). Se obtuvo así la ingesta de nutrientes para cada alimento, y sumando la ingesta de todos estos se obtuvo la ingesta media diaria de nutrientes cruda para cada mujer en el periodo requerido en cada CFA. La ingesta cruda de cada nutriente fue posteriormente ajustada a la ingesta calórica total de cada persona utilizando para ello el método de los residuos de Willett en el que se estiman los residuos a partir de modelos de regresión en los que se usa el logaritmo de la ingesta del nutriente como variable dependiente y el logaritmo de la ingesta energética total como variable independiente (Willett 1998).

Como se indica en la tabla 4, el CFA se recogió en dos ocasiones, en una primera se preguntó por la dieta desde la concepción hasta el momento de la primera entrevista (semanas 10-13), y en una segunda ocasión, se preguntó por la dieta desde la primera visita hasta la última entrevista (Figura 6):



Ingesta de suplementos de Ácido Fólico

La información sobre el uso de suplementos de AF como la fecha inicio, la fecha final, dosis y marca comercial, se recogió en un apartado de preguntas específicas tras el CFA (anexo IV), en las dos ocasiones del embarazo en que se utilizó el CFA. Con todo ello se estimó la ingesta media diaria en μg de AF procedente de suplementos, categorizando por dosis y tipos de suplementos para cada uno de los meses del embarazo. En la primera entrevista se preguntaba por el consumo de suplementos desde tres meses previos al inicio del embarazo, calculándose también el consumo preconcepcional.

Ingesta total de Ácido Fólico

La ingesta de suplementos de AF procedente de suplementos se convirtió a ingesta dietética usando la equivalencia de un $1 \mu\text{g}$ de AF de dieta es igual a $0.6 \mu\text{g}$ de AF de suplementos (Eichholzer et al. 2006). Sumando la ingesta dietética estimada para cada uno de los dos períodos de embarazo, con la procedente de suplementos ya convertida, se obtuvo la ingesta total de AF para cada mes de embarazo. (Figura 7 y 8)

Figura 7. Esquema de ingesta total de Folato de estudio de la cohorte de Valencia del Proyecto INMA en el primer trimestre

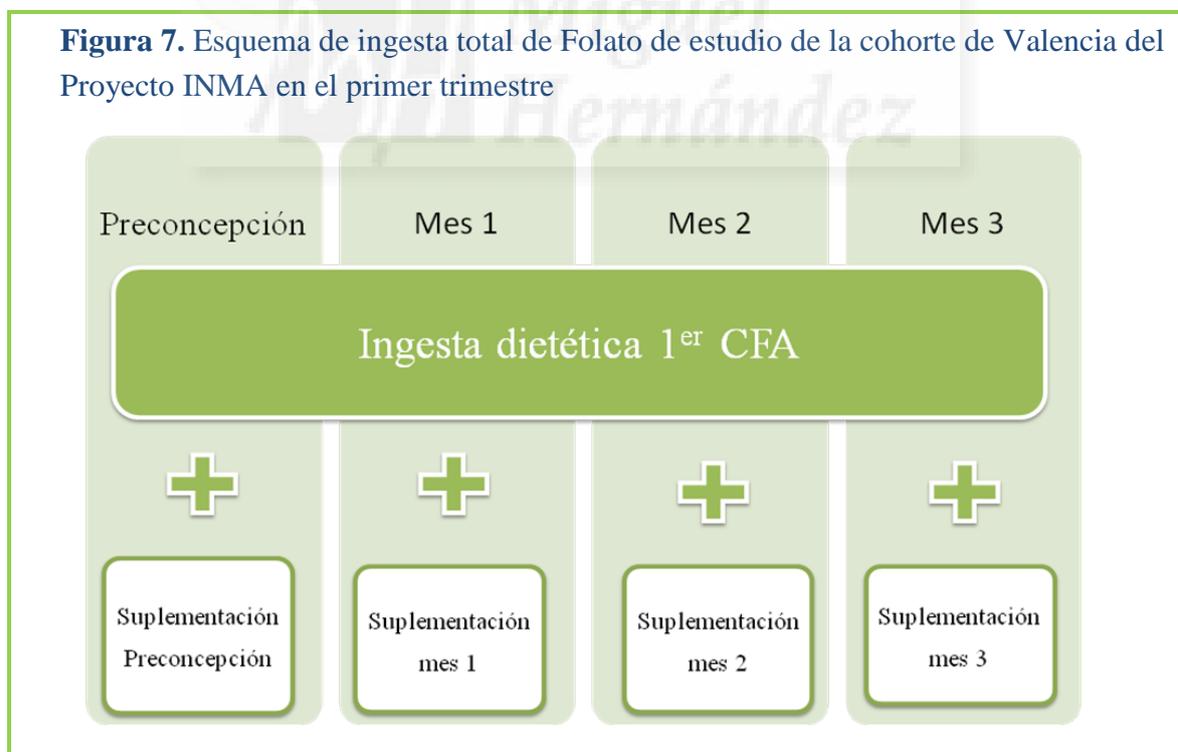
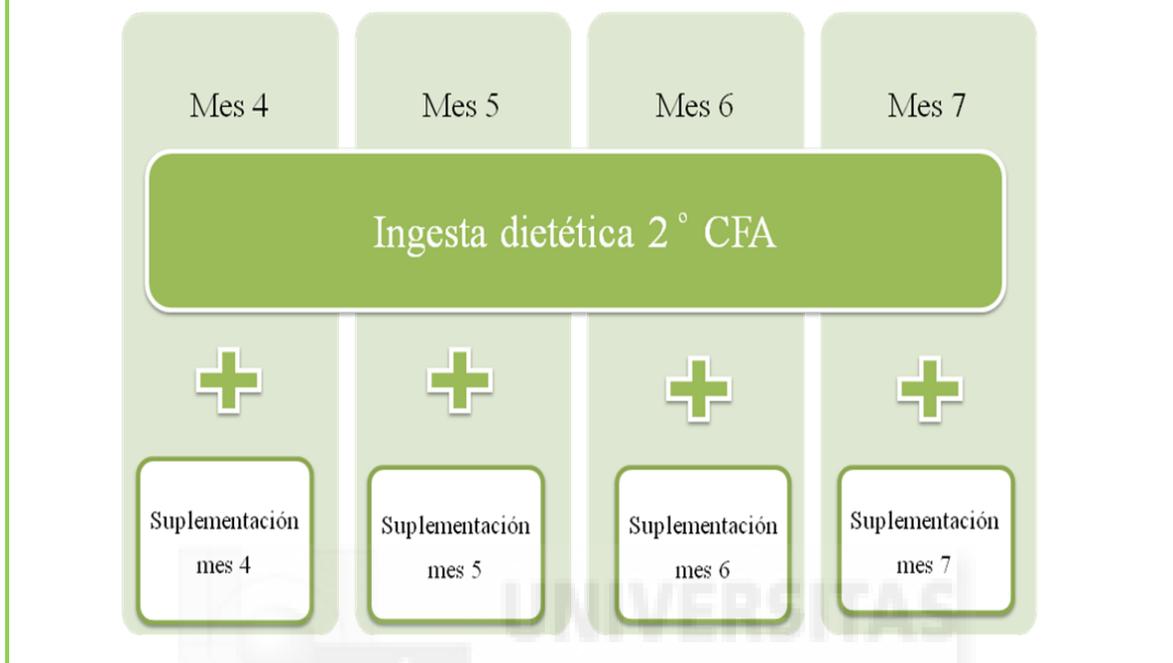


Figura 8. Esquema de ingesta total de Folato de estudio de la cohorte de Valencia del Proyecto INMA en el segundo tercer trimestre



Concentración plasmática de Ácido Fólico

Coincidiendo con la primera entrevista al final del primer trimestre de embarazo se tomaron muestra de sangre periférica.. Las muestras para la medición de folato sérico se recogieron en vacutainers y fueron centrifugadas, transferidas a viales de plástico y congeladas a -80°C hasta el final del estudio. Finalmente, los viales se transportaron en hielo seco al Laboratorio del Hospital de la Universidad de Queen en Belfast para su análisis. La concentración de folato se midió mediante un kit de radioinmunoensayo comercial (SimulTRAC-SNB ICN Pharmaceuticals, California, USA).

Medidas antropométrica del recién nacido.

La información de las medidas antropométricas al nacimiento fue obtenida de registros hospitalarios. El peso al nacimiento en gramos fue recogido por las matronas que atendían a las mujeres en el parto, sin embargo la talla en centímetros fue medida por las enfermeras en las 12 horas posteriores al parto. La edad gestacional fue establecida según la fecha de la última regla que era reportada por la madre. Cuando la diferencia entre la última regla y la ecografía del primer trimestre era igual o superior a 7 días, la edad

gestacional era establecida por la ecografía. En 12.5% de las mujeres fue usada la ecografía del primer trimestre para calcular la edad gestacional. El peso y la talla al nacimiento fueron estandarizados por sexo y edad gestacional usando el método de los residuos. Se definió pequeño para edad gestacional para peso y talla (SGA-W and SGA-H) como aquellos pesos o tallas por debajo del percentil 10 según las tablas españolas para sexo y edad gestacional de Carrascosa (Carrascosa, 2004). Para uno de los nacimientos no pudo ser definido pequeño para edad gestacional ni para talla ni para peso debido a que su edad gestacional (23 semanas) no existe en las tablas poblacionales de referencia.

Otras variables de estudio

La información de otras variables de interés se recogió por los mismos entrevistadores entrenados en las mismas entrevistas en las que se recogió la información dietética (tabla 4). Se recogió información sobre variables sociodemográficas como edad de la madre, nivel de estudios, país de origen, zona de residencia; variables de estilos de vida como consumo de tabaco, consumo de alcohol, horas de televisión durante a la semana, índice de masa corporal preconcepcional de la madre, altura del padre y de la madre preconcepcional. Variables sobre complicaciones médicas pasadas y presentes e historia obstetricia como complicaciones en anteriores embarazos, diabetes gestacional, hipertensión gestacional, ganancia de peso durante el embarazo, embarazo planificado, paridad, visita al ginecólogo privado antes de la semana 12 de embarazo. Una información más completa sobre la categorización y definición de las variables puede encontrarse en cada artículo de los que se presentan en esta tesis.

Análisis Estadístico

Los detalles del análisis estadístico realizado en esta tesis pueden ser consultados en cada uno de los artículos presentados. Un resumen se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis estadísticos realizados en los artículos realizados

Artículo	Objetivo	Análisis
Medicina Clínica	<p>1. Estimar la ingesta de F y AF de dieta y suplementos en embarazo y el cumplimiento de las recomendaciones dietéticas</p> <p>2. Explorar los factores asociados al no cumplimiento de la recomendación de 400 µg/día de suplementos AF periconcepcional.</p> <p>3. Explorar factores asociados a no cumplimiento de la ingesta recomendada (IR) de ingesta total de AF (Dieta más Suplementos) durante todo el embarazo</p>	<p>1. Prueba de t-Student de datos apareados para comparación de las medias de ingestas de folatos en dos periodos diferentes</p> <p>2 y 3. Estimación de Odds Ratios (OR) ajustados e intervalos de confianza del 95% mediante regresión logística múltiple. Variable dependiente: ingesta de suplementos <400 mcg/día desde preconcepción hasta el 2º mes embarazo ó Ingesta total <600 mcg/día en el 1º y 2º-3º trimestre de embarazo.</p>
British Journal of Nutrition	<p>1. Examinar la relación entre la ingesta de folato y el uso de suplementos en la etapa periconcepcional y resultados adversos al nacimiento como pequeño por edad gestacional para peso (SGA-P) y talla (SGA-T).</p>	<p>1. Análisis descriptivo bivariante mediante ANOVA y Kruskal Wallis para comparar media o medianas y chi-cuadrado para comparar variables cualitativas.</p> <p>1. Regresión Logística Múltiple y/o Regresión Lineal Múltiple</p>

<p>ANEXO I</p>	<p>1. Evaluar la reproducibilidad del CFA para medir la ingesta de F.</p> <p>2. Evaluar la validez del CFA para medir la ingesta de F y AF (Dieta más suplementos)</p>	<p>1 Coeficiente de correlación de Pearson* y Spearman entre ingesta de F del CFA1 y del CFA2</p> <p>2. Coeficiente de correlación de Pearson y Spearman entre el folato sérico y la ingesta de F de la dieta y suplementos en el primer periodo estudiado (Preconcepción-mes3)</p>
-----------------------	--	---

* Los análisis mediante coeficientes de correlación para la ingesta dietéticas de F se realizaron con la ingesta de F cruda, transformada logarítmicamente y ajustadas por calorías totales utilizando el método de los residuos de Willett (Willett 1998)

Para los análisis estadísticos utilizamos el programa SPSS (versión 16 para Windows)

ARTÍCULO 1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21070911>)

Eva María Navarrete-Muñoz, Daniel Giménez Monzó, Manoli García de la Hera, María Dolores Climent, Marisa Rebagliato, Mario Murcia, Carmen Iñiguez, Ferran Ballester, Rosa Ramón y Jesús Vioque. Ingesta Dietética y de suplementos de ácido fólico en mujeres embarazadas de Valencia. *Medicina Clínica (Barcelona)* 2010; 135: 637-643

RESUMEN

Objetivo: Analizar la ingesta dietética y de suplementos de Ácido Fólico (AF) durante el embarazo y los factores asociados al incumplimiento de la Ingesta Recomendada (IR) de 600 µg/día y al incumplimiento de 400 µg/día de suplementos para prevenir los defectos del tubo neural.

Métodos: Se incluyeron a 782 embarazadas de la cohorte INMA-Valencia. La ingesta dietética se estimó mediante un cuestionario de frecuencia alimentaria en two periodos de embarazo, desde preconcepción al mes 2 y desde el mes 3 al 7. También se recogió información de la suplementación y se estimó la ingesta total de AF (dieta + suplementos). Usando regresión logística múltiple se exploraron los factores asociados al incumplimiento de las recomendaciones.

Resultados: La ingesta dietética media periconcepcional de AF fue de 304 µg/día. Un 19,2%, 30,2% y 66,2% de embarazadas tomaron suplementos de AF en preconcepción, primer y segundo mes respectivamente. Por otra parte, alrededor del 30% de las mujeres que tomaban suplementos de AF en preconcepción superó el límite superior tolerable de 1.000 µg/día. El ser no española, de bajo nivel de estudios, fumadora, no planificar el embarazo, no haber visitado a ginecólogo privado, haber tenido hijos y no haber tenido antecedentes médicos previos, se asoció al incumplimiento de la IR.

Conclusiones: La dieta sola es insuficiente para alcanzar las IR de AF, puesto que la suplementación se hace tarde y mal. La situación se agrava en mujeres jóvenes, de menor nivel educativo y embarazo no planificado.



Original

Ingesta dietética y de suplementos de ácido fólico en mujeres embarazadas de Valencia

Eva María Navarrete-Muñoz^{a,b,*}, Daniel Giménez Monzó^{a,b}, Manuela García de La Hera^{a,b},
María Dolores Climent^a, Marisa Rebagliato^b, Mario Murcia^{b,c}, Carmen Iñiguez^{c,b},
Ferrán Ballester^{c,b}, Rosa Ramón^d y Jesús Vioque^{a,b}

^a Departamento de Salud Pública, Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, España

^b CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), España

^c Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP), Valencia, España

^d Dirección General de Salud Pública, Conselleria de Sanitat, Servicio de Salud Infantil y de la Mujer, Valencia, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 1 de diciembre de 2009

Aceptado el 30 de marzo de 2010

On-line el 17 de junio de 2010

Palabras clave:

Embarazo

Ácido fólico

Suplementación

Recomendación dietética

RESUMEN

Fundamento y objetivos: Analizar la ingesta dietética y de suplementos de ácido fólico (AF) durante el embarazo y los factores asociados al incumplimiento de la ingesta recomendada (IR) de 600 µg/d y al incumplimiento de 400 µg/d de suplementos para prevenir los defectos del tubo neural.

Pacientes y método: Se incluyeron a 782 embarazadas de la cohorte INMA-Valencia. La ingesta dietética se estimó mediante un cuestionario de frecuencia alimentaria en 2 períodos de embarazo, desde preconcepción al mes 2 y desde el mes 3-7. También se recogió información de la suplementación y se estimó la ingesta total de AF (dieta+suplementos). Usando regresión logística múltiple se exploraron los factores asociados al incumplimiento de las recomendaciones.

Resultados: La ingesta dietética media periconcepcional de AF fue de 304 µg/d. Un 19,2%, 30,2% y 66,2% de embarazadas tomaron suplementos de AF en preconcepción, primer y segundo mes, respectivamente. Por otra parte, alrededor del 30% de las mujeres que tomaban suplementos de AF en preconcepción superó el límite superior tolerable de 1.000 µg/d. El ser no española, de bajo nivel de estudios, fumadora, no planificar el embarazo, no haber visitado a ginecólogo privado, haber tenido hijos y no haber tenido antecedentes médicos previos, se asoció al incumplimiento de la IR.

Conclusiones: La dieta sola es insuficiente para alcanzar las IR de AF, puesto que la suplementación se hace tarde y mal. La situación se agrava en mujeres jóvenes, de menor nivel educativo y embarazo no planificado.

© 2009 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Folic acid intake from diet and supplements in a population of pregnant women in Valencia, Spain

ABSTRACT

Keywords:

Pregnancy

Folic acid

Supplementation

Recommended intake

Background and objectives: We examined the dietary intake and the use of supplements of folic acid (FA) in a cohort of pregnant women. We also explored the factors associated with non-compliance of both the recommended intake (RI) of 600 µg/day and the supplement use of 400 µg/day provided to prevent neural tube defects (NTD).

Patients and methods: We studied 782 pregnant women from the INMA-Valencia cohort. The dietary intake was estimated using a food frequency questionnaire in two periods of pregnancy; from preconception to the second month and from the 3rd to the 7th month. Information on supplement use was also collected which allowed us to estimate the total FA intake (diet+supplements). We explored factors associated with non-compliance of the recommendations by logistic regression.

Results: The periconceptual mean daily FA intake was 304 µg/day. FA supplements were taken by 19.2, 30.2 and 66.2% of women in preconception, first and second month of pregnancy, respectively. Among women using supplements in preconception, 30% exceeded the tolerable upper intake level (UL) of 1.000 µg/day. Non-compliance with RI was more common among women of foreign origin, of low educational level, who smoked, with unplanned pregnancy, who did not visit a private gynaecologist, who had had children or without previous medical illness.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: enavarrete@umh.es (E.M. Navarrete-Muñoz).

Conclusions: Diet by itself is not sufficient to reach RI for FA during pregnancy and many women initiate supplement use after the recommended period and inadequately. The youngest women, with lowest educational attainment and unplanned pregnancies are more likely not to comply.

© 2009 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Es bien conocido que un buen aporte de ácido fólico (AF) en preconcepción y embarazo resulta esencial para asegurar un buen resultado de la gestación y evitar riesgo de malformaciones congénitas graves como los defectos del tubo neural (DTN)¹, los cuales suponen el segundo defecto congénito más común después de las anomalías cardíacas. Los DTN presentaban una gran variabilidad en Europa, que parece haber disminuido en las últimas décadas, presentando los registros españoles tasas bajas a nivel europeo, entre 9-12 casos por 10.000 nacimientos en el período 1990-2004². Desde la publicación en 1991 de los resultados del ensayo clínico del Medical Research Council Vitamin Study Group y otros trabajos posteriores que mostraron un efecto beneficioso del AF, se ha generalizado la recomendación de seguir una dieta variada y rica en AF junto al aporte periconcepcional de 400 µg/d de suplementos de AF sintético para reducir el riesgo de DTN y otras malformaciones fetales^{1,3}. Esta recomendación se ha actualizado y extendido recientemente a todo el embarazo, proponiéndose la ingesta recomendada (IR) de 600 µg/d, considerando el aporte de dieta y suplementos para satisfacer las necesidades materno-fetales de AF⁴. Asimismo, el Instituto de Medicina de EE.UU. ha establecido recientemente el denominado límite superior tolerable de ingesta de AF para adultos mayores de 18 años en 1.000 µg/d (en inglés *tolerable upper intake level*, UL) como el nivel máximo de ingesta diaria de AF que probablemente no comportaría riesgos de efectos adversos en gente sana y en concreto para asegurar que el riesgo de anemia macrocítica debida a un posible déficit de vitamina B12 no pasara desapercibida por un exceso de AF⁵. Aunque hasta la fecha no se ha demostrado toxicidad o efectos adversos por exceso¹, se está llamando últimamente la atención sobre un posible efecto indeseado de usar dosis superiores a la recomendada⁶; recientemente se ha notificado una mayor mortalidad por cáncer y total entre los participantes del seguimiento de 2 ensayos clínicos que tomaron suplementos de 0,8 mg/d durante casi 7 años⁷.

Por ello, resulta de interés vigilar la ingesta de AF, especialmente en embarazadas, ya que han sido pocos los estudios que han descrito la ingesta de AF durante todo el embarazo, teniendo en cuenta la procedente de la dieta y de suplementos, así como el cumplimiento de las IR durante el embarazo. En estudios europeos⁸⁻¹², la ingesta dietética media de AF entre embarazadas suele oscilar entre los 200-300 µg/d, lo que indicaría que un alto porcentaje de mujeres quedarían por debajo de la IR, más aún teniendo en cuenta que el porcentaje de embarazadas que se suplementaban en preconcepción era inferior al 20%^{10,11}. Con alguna excepción¹³, la mayoría de estudios españoles muestran resultados similares¹⁴⁻¹⁷, lo que evidencia también que un alto porcentaje de embarazadas no alcanzarían la IR para el AF.

Con objeto de profundizar en el conocimiento de la ingesta dietética y del uso de suplementos de AF durante todo el embarazo, describimos la ingesta de AF y el uso de suplementos de AF desde la preconcepción hasta el 7.º mes en mujeres embarazadas del estudio de cohortes INMA-Valencia, y analizamos los factores asociados al incumplimiento de las recomendaciones para el AF durante el embarazo.

Sujetos y método

Población

La población de estudio fueron las mujeres embarazadas del proyecto INMA («Infancia y Medio Ambiente») de Valencia, estudio de cohorte prospectivo cuyo objetivo central era analizar el papel de los contaminantes ambientales y la dieta sobre el crecimiento y desarrollo fetal y del niño. Detalles de la metodología del Estudio INMA y de la cohorte de Valencia ya han sido publicados previamente^{18,19}. El reclutamiento se llevó a cabo entre febrero de 2004 y junio de 2005 en las Áreas de Salud 5 y 6 de Valencia, cuando las embarazadas acudían sobre la semana 12 al programa de cribado poblacional de malformaciones congénitas en el hospital «la Fe» de Valencia. Los criterios de inclusión para poder participar en el estudio fueron: residente en el área de estudio, tener un mínimo de 16 años de edad, no tener un embarazo múltiple, no haber seguido ningún programa de reproducción asistida, dar a luz en el hospital de referencia y no tener problemas de comunicación. Las que aceptaron participar firmaron un formulario de consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del Hospital.

De las 1.563 mujeres inicialmente elegibles, fueron incluidas en el estudio después de aceptar el consentimiento informado 840 (tasa de participación del 54%). Quince mujeres que habían participado en noviembre de 2003 en un estudio piloto previo fueron incluidas también. Entre la inclusión del estudio y el parto 31 mujeres sufrieron un aborto, 4 tuvieron una muerte fetal, 28 se retiraron del estudio y 5 se perdieron durante el seguimiento. Con todo ello, fueron finalmente 787 las embarazadas en el estudio que dieron a luz. De ellas, se pudo obtener información completa durante todo el embarazo para 782 embarazadas, que fueron las incluidas en el análisis. No se encontraron diferencias por edad, país de procedencia y otras variables entre las mujeres que participaron y las que no participaron en el estudio, aunque se detectó una proporción ligeramente mayor de mujeres trabajadoras entre las participantes¹⁸, lo que en definitiva no hace pensar en que las participantes difieran sustancialmente de la población general de mujeres embarazadas de Valencia.

Variables de estudio

La información sobre dieta y otras variables recogidas en el estudio se obtuvo mediante entrevistas personalizadas realizadas por entrevistadores entrenados. La ingesta dietética de AF en µg/d se estimó mediante cuestionario semicuantitativo de frecuencia alimentaria (CFA), similar al utilizado por Willett et al en el estudio de Salud de la Enfermeras Norteamericanas²⁰, que ha sido adaptado y validado para usar en población adulta española, incluida en el estudio INMA^{21,22}. El CFA fue administrado en dos ocasiones distintas durante el embarazo, en la visita de inclusión en el estudio entre las semanas 10-13, y entre las semanas 28-32. En la primera ocasión se preguntó por la dieta desde el mes antes de quedar embarazada (preconcepción) hasta el momento de la entrevista (semanas 10-13); en la segunda ocasión se preguntó por la dieta desde la primera visita (semanas 10-13) hasta la última entrevista (alrededor de la semana 32).

También se recogió información sobre el uso de suplementos de AF como la fecha de inicio y de fin de uso, dosis y marca comercial del suplemento usado, lo que permitió categorizar la ingesta de AF por tipo y dosis de suplementos mes a mes. Las embarazadas se clasificaron como no usuarias y usuarias de suplementos por el tipo de suplemento que ingerían. Las usuarias de suplementos se clasificaron a su vez en usuarias de un solo tipo de suplemento o usuarias de más de un tipo de suplementos. Las usuarias de un solo tipo de suplementos se clasificaron en 4 posibles categorías: 1) suplemento de AF específico con dosis recomendadas (i.e., marcas comerciales con presentación de AF a dosis de 400 µg); 2) suplemento de AF a dosis altas (i.e., marcas comerciales con presentación de AF a dosis entre 1.000–10.000 µg); 3) suplementos de levofolinato o folinato cálcico cuyas dosis habituales oscilan entre 2.500–15.000 µg; y 4) suplementos multivitamínicos que incluían AF en dosis entre 75–1000 µg. Por otro lado, las usuarias de más de un tipo de suplementos se clasificaron también en cuatro categorías: 1) suplementos AF a dosis recomendadas más multivitaminas; 2) suplemento AF a dosis altas más multivitaminas; 3) suplementos de folinatos más multivitaminas; y 4) suplementos de AF específico a dosis recomendadas y altas a la vez.

La ingesta de AF procedente de suplementos se convirtió a ingesta dietética usando la equivalencia de un 1 µg de AF de dieta igual a 0,6 µg de AF de suplementos¹. Sumando la ingesta dietética estimada para cada período a la procedente de suplementos convertida se obtuvo la ingesta total de AF para cada mes de embarazo.

Se recogió información sobre variables sociodemográficas: edad (≤ 29 ; 30–34; ≥ 35 años), nivel de estudios (\leq primarios; secundarios; universitarios), país de origen (españolas; extranjeras) y zona de residencia (urbana, metropolitana, semi-urbana, rural); variables sobre estilos de vida como consumo de tabaco (no; sí) y alcohol (no; sí); índice de masa corporal (IMC) preconcepcional (≤ 25 ; 25–29; ≥ 30 kg/m²); variables sobre antecedentes adversos previos en el embarazo (no; sí), entre los que se incluía aborto espontáneo previo, malformaciones congénitas, muertes fetales, nacimientos con bajo peso y pretérminos; número de hijos previos (0; ≥ 1); embarazo planificado (no; sí); y visita al ginecólogo privado antes de la semana 12 de embarazo (no; sí).

Para analizar los factores asociados al incumplimiento de las ingestas recomendadas de AF, se definieron dos posibles tipos. Por una parte, el relacionado a la IR de 400 mcg/d de suplementos para reducir el riesgo de DTN, que se consideró cuando no se alcanzó esa dosis de suplementos en al menos un mes entre preconcepción y el mes 2 de embarazo. Por otra parte, se definió el incumplimiento de la IR de 600 mcg/d establecida para satisfacer las necesidades materno-fetales en el embarazo cuando no se alcanzó esa recomendación en al menos un mes de los dos períodos definidos, desde preconcepción hasta el 3.º mes embarazo, y desde 4.º mes al 7.º mes de embarazo.

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos utilizamos el programa SPSS (versión 16.0 para Windows). Los resultados se muestran en porcentajes para variables cualitativas y con medias, desviación típica y percentiles para las cuantitativas. Para la comparación de la ingesta dietética media diaria entre el 1.º y el 2.º–3.º trimestre de embarazo se utilizó la prueba de comparación de medias para datos apareados (*paired t-test*).

Se estimaron odds ratios (OR) ajustadas por posibles factores de confusión e intervalos de confianza al 95% mediante regresión logística múltiple para detectar los factores asociados a una

ingesta de suplementos inferior a la recomendada (< 400 µg/d) desde preconcepción hasta el 2.º mes de embarazo, y al incumplimiento de la IR de AF (< 600 µg/d) para la ingesta total (dieta+suplementos) en 2 períodos del embarazo. En el modelo multivariante se incluyeron aquellas variables sociodemográficas y reproductivas analizadas en otros estudios revisados en la literatura por su posible influencia en la ingesta y suplementación de AF y en sus efectos, independiente de su significación estadística para facilitar la comparación de resultados con otros estudios.

Resultados

La edad media (DE) de las 782 embarazadas fue de 30,1 (4,6) años, siendo la mayoría de ellas de origen español (87,9%) y con un 33,6% sin superar estudios primarios. Un 23,5% de los embarazos fue no planificado y el 55,1% de las embarazadas no habían tenido hijos previos. Un 20,8% de embarazadas había tenido al menos algún tipo de antecedente adverso en embarazos previos como aborto espontáneo (12,8%), embarazo pretérmino (6,4%), bajo peso (4,2%), malformaciones (2,2%) y muertes fetales (1,3%). Durante el embarazo el 65% de las embarazadas no consumía alcohol y el 75% no fumaban en el 3.º trimestre de embarazo.

La ingesta dietética media de AF fue muy similar en el primer trimestre de embarazo (304 [100] µg/d) y en el segundo-tercer trimestre (297 [107] µg/d), no observándose diferencia significativa entre ambos períodos (tabla 1). Tomando en cuenta solo la ingesta dietética, alrededor del 99% de las embarazadas no alcanzaron la IR en ningún momento del embarazo. Al considerar la toma de suplementos, un 80,3 y 69,3% seguían sin alcanzar la IR de AF en preconcepción y en primer mes de embarazo, respectivamente; a partir del 2.º mes este porcentaje disminuyó hasta el 33,9% y se alcanzó el mínimo incumplimiento del 7% en el 3.º mes (tabla 1). Los principales grupos de alimentos contribuidores a la ingesta dietética de AF en ambos períodos del embarazo fueron las verduras (que aportaron un 25,8%), las frutas (15,5%), las legumbres (9,5%), los lácteos (9,4%) y el pan (8,7%). A nivel individual, los alimentos que más aportaron fueron las lechugas (9,4%), las legumbres (8,7%), el pan blanco (6,5%), las naranjas (5,3%) y los cereales (4,9%).

El porcentaje de mujeres que tomaban suplementos de AF en la etapa preconcepcional, primer y segundo mes de embarazo fue del 19,2, 30,2 y 66,2%, respectivamente, y alcanzó el 93,9%, porcentaje que fue disminuyendo ligeramente hasta el final del embarazo. Si en la etapa preconcepcional y primer mes de embarazo se solía tomar un solo tipo de suplemento (95,3 y 89,4%, respectivamente), a partir del segundo mes la proporción de mujeres que utilizaban más de un tipo de suplementos fue aumentando hasta superar el 50% a partir del 3.º mes de embarazo. La combinación de suplementos más frecuente utilizada desde el 2.º mes hasta el 7.º mes fue AF específico a dosis altas junto a un complejo vitamínico, seguido de la combinación de AF específico a dosis recomendada junto a complejo vitamínico y la de levofolinato con complejo vitamínico.

El patrón de uso de suplementos de un solo tipo presenta una gran variabilidad, como se muestra en la figura 1. El tipo más usado en preconcepción fue el suplemento de AF específico a dosis recomendadas (57,4%) después del 1.º mes su uso experimentó un incremento hasta alcanzar un máximo en el 3.º mes (78,3%) y descender posteriormente hasta el 7.º mes (20,4%). El 2.º tipo de suplemento único más usado en preconcepción fue AF específico a dosis altas (31,7%); tras el 1.º mes, la proporción de mujeres que utilizaban este tipo de suplemento fue descendiendo hasta 3,2% en el 7.º mes. A partir del 5.º mes el uso de complejos vitamínicos

Tabla 1
Ingesta dietética y total (dieta más suplementos^a) de ácido fólico (AF) en preconcepción y por mes de embarazo, y del incumplimiento de la ingesta recomendada (IR=600 mcg/d) en mujeres de la cohorte INMA-Valencia, 2003-05 (n=782)

	Media	DE	Percentiles					% Incumplimiento IR (< 600 µg/d)
			P5	P25	P50	P75	P95	
Ingesta Dietética								
Preconcepción-1.º trimestre	304	100	165	233	293	360	475	99,0
2.º- 3.º trimestre	297	107	158	222	280	357	497	98,7
p-valor ^b	0,080							
Ingesta Total (dieta y suplementos^a)								
Preconcepción	1.041	2.455	170	248	323	461	8.613	80,3
1.º Mes	1.435	3.084	172	259	349	905	8.670	69,3
2.º Mes	2.223	3.585	193	348	958	1.257	8.894	33,9
3.º Mes	2.636	3.445	328	967	1.142	1.415	8.975	7,0
4.º Mes	2.234	3.083	329	887	1.117	1.347	8.888	14,3
5.º Mes	2.058	2.951	287	678	1.106	1.327	8.899	21,2
6.º Mes	1.731	2.680	282	571	1.007	1.278	8.870	27,9
7.º Mes	1.629	2.497	254	548	925	1.275	8.854	31,5

Valores en mcg/d.

^a Ingesta de suplementos AF ajustada por la Equivalencia de Folato Dietético: 1 µg/d AF de dieta=0,6 µg/d de AF de suplementos.

^b p-valor para el t-test de muestras apareadas.

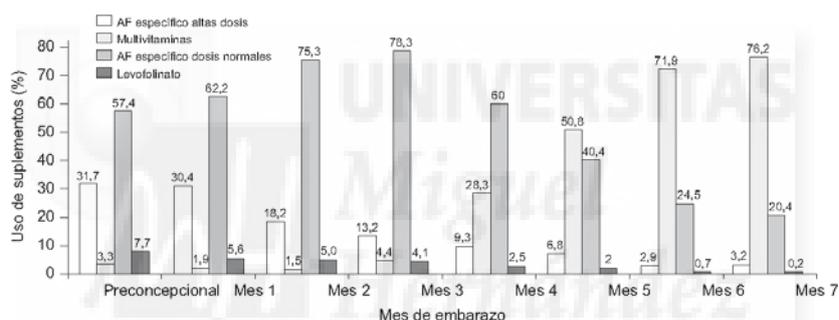


Figura 1. Evolución del patrón de uso de suplementos individualizado de ácido fólico (AF) en preconcepción y por mes de embarazo. Estudio INMA-Valencia, 2003-2005 (n=782).

superó al de AF específicos. El levofolinato fue el tipo de suplemento menos utilizado, observándose un descenso de su uso a lo largo del embarazo.

Respecto a la dosis de AF tomada en los suplementos durante el embarazo, se ha observado una gran variabilidad, con las dosis más altas observada en los primeros meses de embarazo y un progresivo descenso de dosis las hasta el 7.º mes (tabla 2). Prácticamente todas las mujeres que tomaban suplementos con AF hasta el tercer mes de embarazo, mes hasta donde alcanza la recomendación, superaban la dosis recomendada de 400 mcg/d; a partir del 3.º mes el porcentaje de mujeres que dejó de alcanzar la dosis de 400 mcg/d recomendada en periconcepción fue disminuyendo hasta el 61,9% en el 7.º mes. Por otra parte, un 38,7% de las mujeres que se suplementaban en preconcepción (n=150) superaron el límite superior tolerable de 1.000 µg/d, porcentaje que se fue reduciendo paulatinamente hasta el 13% en el sexto y 7.º mes del embarazo, cuando ya la mayoría de mujeres se suplementaban (n=675, 89%). Respecto al inicio de la suplementación, la mayoría de mujeres la iniciaron en el 2.º y 3.º mes, con un 36,2 y 28,4%, respectivamente (tabla 2).

Los factores que se asociaron de forma estadísticamente significativa (p < 0,05) a una ingesta de suplementos inferior a 400 µg/d durante el período preconcepcional (desde preconcepción

hasta el 2.º mes de embarazo) fueron: ser de origen extranjero (OR=3,23), ser fumadora en el 1.º trimestre (OR=2,68) y haber tenido hijos previos (OR=2,74), un menor nivel de estudios (estudios universitarios frente a ≤ primarios, OR=0,43), no haber planificado el embarazo (OR=0,22), no haber visitado a ginecólogo privado (OR=0,63) y no haber tenido antecedentes adversos previos (OR=0,43) (tabla 3). Las mismas asociaciones se observaron en relación al incumplimiento de la IR de 600 µg/d para la ingesta total de AF en algún mes desde preconcepción hasta el 3.º mes de embarazo (tabla 4). Por otra parte, los factores que se asociaron significativamente al incumplimiento de la IR para el segundo período (4.º-7.º mes) fueron: residir en zona rural frente a zona urbana (OR=2,29) y, marginalmente significativa, la edad (30-34 años frente a < 29 años, OR=0,72).

Discusión

Los resultados de este estudio demuestran que la ingesta de alimentos por sí sola es insuficiente para que la mayoría de embarazadas alcancen la IR de AF (≥ 600 µg/d) durante todo el embarazo (y de 400 mcg/d en periconcepción). La toma de suplementos de AF resuelve solo en parte el problema, ya que no evita que un porcentaje muy amplio de embarazadas (> 80%) sigan

Tabla 2

Ingesta de suplementos de ácido fólico (AF) en $\mu\text{g}/\text{d}$ y porcentaje de embarazadas que toman menos de 400 $\mu\text{g}/\text{d}$ y más de 1.000 $\mu\text{g}/\text{d}$ de suplementos de AF en mujeres que indicaron tomar suplementos de la cohorte INMA-Valencia, 2003-05

	Toma de suplementos N (%)	Media	DE	Inicio de la suplementación N (%)	Dosis de suplementos($\mu\text{g}/\text{d}$)	
					% < 400 $\mu\text{g}/\text{d}$	% \geq 1.000 $\mu\text{g}/\text{d}$
Preconcepción	150 (19,2)	2.306	2.647	150 (19,2)	2,0	38,7
1.º Mes	236 (30,2)	2.250	2.791	86 (11,3)	1,3	36,0
2.º Mes	518 (66,2)	1.739	2.440	282 (36,2)	1,2	25,9
3.º Mes	734 (93,9)	1.491	2.098	222 (28,4)	1,8	22,2
4.º Mes	723 (92,4)	1.257	1.894	27 (3,5)	11,8	18,4
5.º Mes	703 (90,0)	1.176	1.831	4 (0,5)	20,5	17,4
6.º Mes	699 (89,6)	963	1.674	2 (0,3)	33,2	13,7
7.º Mes	675 (88,6)	926	1.578	0 (0,0)	38,1	13,6

Tabla 3

Factores asociados a una ingesta <400 $\mu\text{g}/\text{d}$ de suplementos de ácido fólico (sAF) desde preconcepción hasta segundo mes de embarazo (regresión logística múltiple). Estudio INMA-Valencia (n=782)

	N Total	Preconcepción-Mes 2	
		sAF < 400 $\mu\text{g}/\text{d}$ % (N)	OR (IC 95%)
Edad			
< 29 años	355	84,8 (301)	1,00
30-34 años	301	77,7 (234)	0,73 (0,46-1,15)
\geq 35 años	126	81,7 (103)	0,75 (0,40-1,40)
País de origen			
Española	687	80,1 (550)	1,00
Extranjera	95	92,6 (88)	3,23 (1,40-7,44)
Nivel de estudios			
\leq Primarios	263	88,6 (233)	1,00
Secundarios	334	81,7 (273)	0,73 (0,44-1,21)
Universitarios	185	71,4 (132)	0,43 (0,25-0,75)
IMC			
\leq 25	561	80,9 (454)	1,00
25 \leq IMC < 30	145	82,8 (120)	0,96 (0,57-1,63)
\geq 30	76	84,2 (64)	1,11 (0,54-2,27)
Zona de residencia			
Urbana	70	78,6 (55)	1,00
Metropolitana	378	81,0 (306)	1,23 (0,61-2,47)
Semirurbana	283	83,4 (236)	1,31 (0,64-2,70)
Rural	49	81,6 (40)	1,55 (0,55-4,37)
Consumo de alcohol			
No	544	81,1 (441)	1,00
Sí	238	82,8 (197)	1,07 (0,69-1,66)
Consumo de tabaco			
No	588	78,4 (461)	1,00
Sí	194	91,2 (177)	2,68 (1,51-4,72)
Paridad			
0 Hijos	431	77,0 (332)	1,00
1 o más	351	87,2 (306)	2,74 (1,69-4,45)
Embarazo planificado			
No	184	95,1 (175)	1,00
Sí	589	77,2 (455)	0,22 (0,11-0,45)
Visita a ginecólogo			
No	515	85,0 (438)	1,00
Sí	267	74,9 (200)	0,63 (0,42-0,94)
Antecedentes previos*			
No	619	82,6 (511)	1,00
Sí	163	77,9 (127)	0,43 (0,25-0,72)

IC 95%: intervalo de confianza del 95%; IMC: índice de masa corporal; OR: odds ratio.

*Antecedentes previos se refiere a sufrir en partos anteriores algún tipo de los antecedentes: muertes fetales, aborto espontáneo previo, malformaciones, bajo peso y prematuro.

sin alcanzar la IR en todos los meses del embarazo y especialmente durante el período más crítico del embarazo, desde la preconcepción hasta el 2.º mes de embarazo. Hemos evidenciado también que el uso de suplementos se inicia tardíamente (después del 2.º

mes) en una de cada 4 mujeres y alrededor de un tercio de las mujeres que manifiestan tomar suplementos de AF lo hacen en exceso, superando la UL de 1.000 $\mu\text{g}/\text{d}$. El tipo de suplementación más común fue la de AF específico y la combinación de AF específico junto a un complejo vitamínico.

El aporte dietético de folato por sí solo no parece suficiente para minimizar los riesgos potenciales que ello conlleva en el período más sensible de periconcepción, especialmente al considerar la insatisfactoria suplementación observada en ese período. A pesar de ubicarse en un área mediterránea, la ingesta estimada de AF en las embarazadas de nuestro estudio ha sido muy similar a la observada en otros estudios de europeos y españoles^{9-11,15}, e inferior a la estimada en estudios previos realizados con mujeres en edad fértil y embarazadas de la misma área geográfica^{13,23}. En cualquier caso, se pone en evidencia la necesidad de establecer estrategias más eficaces para reducir la alta proporción de mujeres en riesgo potencial.

Es de resaltar que, a pesar de las recomendaciones existentes, solo una de cada 5 embarazadas reconoció haber tomado suplementos de AF en preconcepción. Esta proporción ha sido superior a la observada en estudios previos^{24,25}, y similar a la estimada en otros estudios recientes en Portugal y en el Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas^{26,27}, pero sigue siendo inferior a la observada en otros países europeos como Inglaterra (26,4%) y Holanda (27,6%)^{9,12}. La menor proporción de uso de suplementos observada en nuestro estudio podría deberse en parte a que un 23,5% de embarazos eran no planificados e incluso a que muchas mujeres no conocían su embarazo incluso hasta en el 2.º y 3.º mes de embarazo, lo que debería tomarse en cuenta a la hora de hacer comparaciones entre países y establecer estrategias para mejorar la ingesta de AF en preconcepción.

Por otra parte, en los embarazos que sí habían sido planificados (76,5%) se observó que un 87% de las embarazadas no tomaron suplementos de AF en preconcepción, probablemente por desconocimiento de la conveniencia y beneficios de tener una ingesta adecuada de AF y de las principales fuentes de aporte, como se ha apuntado en algunos estudios^{28,29}. En un estudio con población mediterránea se evidenció un gran desconocimiento sobre los beneficios de la toma de suplementos y de las fuentes de AF, ya que solo el 25% de las mujeres afirmaba haber sido informada sobre la necesidad de tomar AF para prevenir malformaciones congénitas³⁰, a pesar incluso que la mitad de ellas tenían conocimiento de las malformaciones congénitas, y solo el 40,6% fue capaz de identificar algún alimento rico en AF.

Junto al uso insuficiente de suplementos de AF en periconcepción, hemos observado una gran variabilidad en la dosis y tipo de suplementos, hallazgo también señalado en estudios previos^{24,31}. En este sentido, llama la atención que hasta el 30% de las mujeres que se suplementaban superaban el límite superior tolerable (> 1.000 $\mu\text{g}/\text{d}$) desde la preconcepción hasta el 2.º mes de

Tabla 4

Factores asociados a no alcanzar la ingesta recomendada (IR) de 600 µg/d para satisfacer las necesidades materno-fetales, considerando ingesta total (dieta + suplementos^a) de ácido fólico (AF), en dos periodos del embarazo (regresión logística múltiple). Estudio INMA-Valencia (n=782)

	Preconcepción-Mes 3		Mes 4-Mes 7	
	Incumplimiento IR % (N)	OR (IC 95%)	Incumplimiento IR % (N)	OR (IC 95%)
Edad				
< 29 años	83,1 (295)	1,00	40,6 (144)	1,00
30-34 años	77,7 (234)	0,81 (0,52-1,27)	33,9 (102)	0,72 (0,51-1,01)
≥ 35 años	81,0 (102)	0,80 (0,44-1,47)	35,7 (45)	0,78 (0,49-1,24)
País de origen				
Española	79,5 (546)	1,00	37,7 (259)	1,00
Extranjera	89,5 (85)	2,19 (1,07-4,52)	33,7 (32)	0,75 (0,46-1,23)
Nivel de estudios				
≤ Primarios	86,3 (227)	1,00	35,0 (92)	1,00
Secundarios	81,4 (272)	0,91 (0,56-1,47)	39,5 (132)	1,29 (0,91-1,84)
Universitarios	71,4 (132)	0,54 (0,32-0,91)	36,2 (67)	1,28 (0,83-1,96)
IMC				
≤ 25	80,2 (450)	1,00	36,4 (204)	1,00
25 < IMC < 30	81,4 (118)	0,94 (0,57-1,55)	40,0 (58)	1,15 (0,78-1,71)
≥ 30	82,9 (63)	1,10 (0,55-2,19)	38,2 (29)	1,07 (0,64-1,79)
Zona de residencia				
Urbana	75,7 (53)	1,00	30,0 (21)	1,00
Metropolitana	80,2 (303)	1,40 (0,72-2,72)	35,7 (135)	1,45 (0,81-2,58)
Semiurbana	82,7 (234)	1,54 (0,77-3,05)	39,6 (112)	1,69 (0,94-3,04)
Rural	81,6 (40)	1,83 (0,67-5,01)	46,9 (23)	2,29 (1,04-5,08)
Consumo de alcohol				
No	80,3 (437)	1,00	39,8 (194)	1,00
Sí	81,5 (194)	1,03 (0,67-1,57)	32,9 (97)	0,76 (0,56-1,04)
Consumo de tabaco				
No	77,6 (456)	1,00	36,4 (219)	1,00
Sí	90,2 (175)	2,54 (1,47-4,38)	40,0 (72)	1,22 (0,91-1,84)
Paridad				
0 Hijos	76,1 (328)	1,00	36,7 (158)	1,00
1 o más	86,3 (303)	2,55 (1,60-4,08)	37,9 (133)	1,14 (0,81-1,60)
Embarazo planificado				
No	93,5 (172)	1,00	37,0 (68)	1,00
Sí	76,6 (451)	0,28 (0,15-0,53)	37,0 (218)	1,04 (0,73-1,49)
Ginecólogo privado				
No	84,1 (433)	1,00	37,1 (191)	1,00
Sí	74,2 (198)	0,63 (0,43-0,93)	37,5 (100)	0,98 (0,71-1,35)
Antecedes previos*				
No	81,6 (505)	1,00	36,8 (228)	1,00
Sí	77,3 (126)	0,47 (0,29-0,78)	38,7 (65)	1,06 (0,72-1,58)

IC 95%: intervalo de confianza del 95%; IMC: índice de masa corporal; OR: odds ratio.

^a Ingesta de suplementos de AF ajustada por la Equivalencia de Folato Dietético: 1 µg/d AF de dieta = 0,6 µg/d de AF de suplementos.

*Antecedentes previos se refiere a sufrir en partos anteriores algún tipo de los antecedentes: muertes fetales, aborto espontáneo previo, malformaciones, bajo peso y prematuro.

embarazo. Una posible explicación de ello podría ser que lo hicieran por prescripción médica, por ejemplo por haber tenido antecedentes previos de malformaciones; sin embargo, solo son un 2,2% de las mujeres declararon haber tenido este tipo de antecedentes. Otra posible explicación aplicable al segundo y 3.^{er} mes de embarazo podría ser la prescripción de preparados de levofolinato o folinato cálcico para intentar recuperar más rápidamente un posible déficit al no haberse iniciado la suplementación en preconcepción; no obstante, solo un 2% de mujeres tomaron este tipo de suplementos supuestamente de absorción más eficiente, y la mayoría de las dosis excesivas se alcanzaron con preparados de AF específico a dosis altas o con una combinación de más de un tipo de suplemento. Recientemente ha habido debate y controversia sobre las posibles consecuencias del uso de suplementos con dosis más altas de lo recomendado (> 400 mcg /d)^{32,33}, y que ello haya podido influir en el menor uso de dosis excesivas de AF en preconcepción observada en nuestro estudio (38,7%) respecto a lo observado en el estudio ECEM realizado en 2003-2004 con mujeres sin riesgo de defectos del tubo (80%). Aun en el caso de que se haya producido una mejora en un corto período, cuesta justificar la enorme variedad de dosis y tipos de suplementos de AF que existen en el mercado español, y menos el exceso de dosificación. Aunque considerada

una vitamina de escasa o nula toxicidad, se ha llamado la atención sobre las características de los suplementos de AF y su metabolismo, y el posible riesgo potencial para la salud si se superan las dosis recomendadas⁶. Posiblemente por ello, el Instituto de Medicina de EE.UU. estableció la UL, para evitar también un posible enmascaramiento de anemia perniciosa por déficit de vitamina B12 y dosis excesiva de AF^{5,7}.

Al igual que cualquier estudio observacional, este estudio puede presentar limitaciones, como un posible sesgo por la baja tasa de participación, lo que podría limitar la generalización de nuestros hallazgos a otras embarazadas. Sin embargo, cuando se compararon las características sociodemográficas entre participantes y no participantes en nuestro estudio, no se encontraron diferencias significativas¹⁹, descartándose un impacto importante del mismo si lo hubiera. Respecto a la fiabilidad de la evaluación dietética de folato mediante CFA, es posible que se haya podido producir algún tipo de error en la estimación de la ingesta absoluta de este nutriente al no haber sido específicamente validado en embarazadas, sin embargo sí lo ha sido en población adulta del mismo área geográfica³¹; por otra parte, las estimaciones han sido muy similares a las observadas en otros estudios españoles^{15,14}, lo que apoyaría indirectamente su validez.

Pensamos pues que los resultados de este estudio ofrecen el cuadro más completo y actual sobre la ingesta de AF en embarazadas españolas durante todo su embarazo, siendo obvio que se suplementan tarde y mal, y puesto que no hay duda acerca de los beneficios del consumo óptimo de AF, parece razonable promover estrategias para mejorar la situación actual. En este sentido, además de la difusión de estos resultados entre matronas y ginecólogos, los actores principales de la prescripción de suplementos^{24,31}, creemos justificado abrir debates como el de la posible fortificación de alimentos (ej. harinas) como medida de protección de salud cuya eficacia y ausencia de efectos negativos ha sido demostrada en otros países^{1,34}. Ello no es incompatible con otras estrategias poblacionales para mejorar la suplementación periconcepcional de AF, especialmente entre las mujeres más susceptibles como las de un menor nivel de estudio, de origen extranjero y menor acceso a los cuidados prenatales y que puedan tener un mayor riesgo de alteraciones en el embarazo. Por otra parte, ante la incipiente evidencia de que una suplementación a dosis excesiva puede no ser inocua, junto al hecho del mayor coste de los fármacos de altas dosis frente a los que contienen dosis recomendadas de AF, serían argumentos suficientes para implementar estrategias poblacionales que eviten esta suplementación innecesaria y costosa. Sin eludir responsabilidades, es la administración sanitaria a los distintos niveles de acción la que debería liderar el proceso para resolver una situación de riesgo potencial para un amplio sector de la población.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado con ayudas del Instituto de Salud Carlos III (Red INMA G03/176 y CB06/02/0041), FIS-FEDER (03/1615, 04/1509, 04/1112, 06/1213 y 07/0314), Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2002-03508) y Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana (012/2009; CTGCA/2002/06; G03/136).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a todos los participantes del estudio INMA por su generosa participación. También a Amparo Quiles y Amparo Cases por su apoyo en el trabajo de campo y la recogida de datos nutricionales.

Bibliografía

- Eichholzer M, Tönz O, Zimmermann R. Folic acid: a public-health challenge. *Lancet*. 2006;367:1352–61.
- García López E, Rodríguez Dehli C, Ariza Hevia F, Rodríguez Fernández A, Fernández Toral J, Riaño Galán I, et al. Prevalence of neural tube defects in Asturias (Spain): impact of prenatal diagnosis. *Gac Sanit*. 2009;23:506–11.
- MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *MRC Vitamin Study Research Group*. *Lancet*. 1991;338:131–7.
- Cuervo M, Corbalán M, Baladía E, Cabrero L, Formiguera X, Iglesias C, et al. Comparison of dietary reference intakes (DRI) between different countries of the European Union, The United States and the World Health Organization. *Nutr Hosp*. 2009;24:384–414.
- Institute of Medicine I. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, DC: National Academy Press; 1998.
- Lucock M. Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *BMJ*. 2004;328:211–4.
- Ebbing M, Bønaa K, Nygård O, Arnesen E, Ueland P, Nordrehaug J, et al. Cancer incidence and mortality after treatment with folic acid and vitamin B12. *JAMA*. 2009;302:2119–26.
- Hassapidou M, Papadopoulou N. Assessment of the dietary intakes of healthy adult pregnant women in Cyprus. *Nutr Food Sci*. 2000;30:111–5.
- Mouratidou T, Ford F, Prountzou F, Fraser R. Dietary assessment of a population of pregnant women in Sheffield, UK. *Br J Nutr*. 2006;96:929–35.
- Pinto E, Barros H, dos Santos Silva I. Dietary intake and nutritional adequacy prior to conception and during pregnancy: a follow-up study in the north of Portugal. *Public Health Nutr*. 2009;12:922–31.
- Arkkola T, Uusitalo U, Pietikäinen M, Metsälä J, Kronberg-Kippilä C, Erkkola M, et al. Dietary intake and use of dietary supplements in relation to demographic variables among pregnant Finnish women. *Br J Nutr*. 2006;96:913–20.
- Roza S, van Batenburg-Eddes T, Steegers E, Jaddoe V, Mackenbach J, Hofman A, et al. Maternal folic acid supplement use in early pregnancy and child behavioural problems: The Generation R Study. *Br J Nutr*. 2009;1–8.
- Cárcel C, Quiles J, Rico B, Sanchis T. Adecuación de la ingesta nutricional de embarazadas de segundo y tercer trimestre. *Rev Esp Nutr Comunitaria*. 2005;11:136–44.
- Iriés Rocamora JA, Iglesias Bravo EM, Avilés Mejía S, Bernal López E, Benito del Valle Galindo P, Moriones López L, et al. Valor nutricional de la dieta en embarazadas sanas. Resultado de una encuesta dietética en gestantes. *Nutr Hosp*. 2003;18:248–52.
- Arija V, Cucó G, Vila J, Iranzo R, Fernández-Ballart J. Food consumption, dietary habits and nutritional status of the population of Reus: follow-up from preconception throughout pregnancy and after birth. *Med Clin (Barc)*. 2004;123:5–11.
- Mariscal-Arcas M, Rivas A, Monteagudo C, Granada A, Cerrillo I, Olea-Serrano F. Proposal of a Mediterranean diet index for pregnant women. *Br J Nutr*. 2009;102:744–9.
- Ortiz-Andrellucchi A, Sánchez-Villegas A, Ramírez-García O, Serra-Majem L. Assessment of nutritional quality in healthy pregnant women of the Canary Islands, Spain. *Med Clin (Barc)*. 2009;133:615–21.
- Ramón R, Ballester F, Aguinalde X, Amurrio A, Vioque J, Lacasaña M, et al. Fish consumption during pregnancy, prenatal mercury exposure, and anthropometric measures at birth in a prospective mother-infant cohort study in Spain. *Am J Clin Nutr*. 2009;90:1047–55.
- Ramón R, Ballester F, Irigoyen C, Rebagliato M, Murcia M, Esplugues A, et al. Vegetable but not fruit intake during pregnancy is associated with newborn anthropometric measures. *J Nutr*. 2009;139:561–7.
- Willett W, Sampson L, Stampfer M, Rosner B, Bain C, Witschi J, et al. Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Am J Epidemiol*. 1985;122:51–65.
- Vioque J, Weinbrenner T, Asensio I, Castelló A, Young I, Fletcher A. Plasma concentrations of carotenoids and vitamin C are better correlated with dietary intake in normal weight than overweight and obese elderly subjects. *Br J Nutr*. 2007;97:977–86.
- Vioque J. Validez de la evaluación de la ingesta dietética. En: Serra Majem LABJ, editor. *Nutrición y Salud Pública. Métodos, bases científicas y aplicaciones*. Barcelona: Masson-Elsevier; 2006. p. 199–210.
- Vioque J, Quiles J, García de la Hera M, Guillén M, Ponce E, Muñoz P. Folic acid ingestion and associated factors in adult women 15–44 years of age in the Valencian Community. *Med Clin (Barc)*. 2000;114:414–6.
- Gilbert M, Juncosa N, Martín I. Prevención Primaria de los defectos del tubo neural en la población atendida en un hospital de referencia. *Prog Obstet Ginecol*. 2000;43:13–22.
- Gutierrez J, Perez F, Tamparillas M, Calvo M. Prevención de los defectos del tubo neural mediante la suplementación adecuada con ácido fólico. *Aten Farm*. 2003;5:84–92.
- Martínez-Frías M. ECEM Gdtd. Adecuación de las dosis de ácido fólico en la prevención de defectos congénitos. *Med Clin (Barc)*. 2007;128:609–16.
- Martínez-Frías ML, Rodríguez-Pinilla E, Bermejo E. Análisis de la situación en España sobre el consumo de ácido fólico/folinato cálcico para la prevención de defectos congénitos. *Med Clin (Barc)*. 2003;121:772–5.
- Pérez-Vázquez A, Vidal Alvarez R, Castro Pazos M, Aulet Ruiz A. Prevención de la pre-concepción use of folic acid in the northern part of Pontevedra. *Aten Primaria*. 2003;32:437.
- Huttly W, Wald N, Walters J. Folic acid supplementation before pregnancy remains inadequate. *BMJ*. 1999;319:1499.
- Coll O, Pisa S, Palacio M, Quintó L, Cararach V. Awareness of the use of folic acid to prevent neural tube defects in a Mediterranean area. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;115:173–7.
- García Carballo M, González González A, Jiménez García R. Prophylaxis of neural tube defects with folic acid in pregnant women from a health district. *Aten Primaria*. 2003;31:98–103.
- Martínez-Frías M. Folic acid: a public-health challenge. *Lancet*. 2006;367:2057.
- Fabre E, Gallo M, Lou A, Juste G, Romero M, Blasco C, et al. Effects of levofolinic acid on plasma homocysteine concentrations in healthy and young women in preconceptional care. *Med Clin (Barc)*. 2001;117:211–5.
- Honein M, Paulozzi L, Mathews T, Erickson J, Wong L. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA*. 2001;285:2981–6.

María Pastor-Valero, Eva María Navarrete-Muñoz, Marisa Rebagliato, Carmen Iñiguez, Mario Murcia, Alfredo Marco, Ferran Ballester, Jesús Vioque. Periconcepcional Folic Acid supplementation and anthropometric measures at birth in a cohort of pregnant women in Valencia, Spain. *British Journal Nutrition* 2011; Jan 28: 1-9
doi:10.1017/S0007114510005143

RESUMEN:

Examinamos la relación entre la ingesta de folato de la dieta y el uso de suplementos periconcepcional de Ácido Fólico (AF) y pequeño por edad gestacional para peso (SGA-W) y talla (SGA-H). El estudio esta basado en 786 mujeres españolas de más de 16 años, atendidas en el cribado poblacional (10-13 semanas) de síndrome Down, en el hospital de referencia “La FE” y que no fueran a tener un parto múltiple. El uso periconcepcional de uso de suplementos se categorizo en no usuarias, usuarias moderadas $\leq 1\text{mg/d}$ y usuarias de dosis más altas $>1\text{mg/d}$. Las madres que usaban dosis más altas de AF tenían una reducción significativa del peso medio comparado con las no usuarias ($\beta = -0.53$; $\text{IC}_{95\%}: -0.96, -0.09$). En cuanto al peso, madres que usaban moderadas y altas dosis de AF tenían hijos con menor peso por edad gestacional que las madres que no eran usuarias de suplementos. ($\beta = -22.96$; $\text{IC}_{95\%}: -101.14, 55.23$; $\beta = -89.72$, $\text{IC}_{95\%}: -188.64, 9.21$, respectivamente), sin embargo este decrecimiento no era estadísticamente significativo. Los resultados de los modelos de regresión logística multivariante mostraron que altas dosis de AF tenían un mayor riesgo de SGA-H ($\text{OR} = 5.33$; $\text{IC}_{95\%}: 2.08, 13.7$), y que los usuarios de dosis moderadas no estaban asociados con un mayor riesgo ni para SGA-W ni para SGA-H. Por el contrario, observamos que para los quintiles de ingesta de folato esta asociado con un decrecimiento del riesgo SGA-W (p-valor para p-trend=0.002), sin embargo no esta asociación no se ve para SGA-H. Nuestros hallazgos sugieren que el uso periconcepcional de suplementos de AF de más de 1mg está asociado con un decrecimiento del peso al nacimiento y puede conllevar a un mayor riesgo de bajo peso al nacimiento.

Periconceptional folic acid supplementation and anthropometric measures at birth in a cohort of pregnant women in Valencia, Spain

Maria Pastor-Valero^{1,2*}, Eva Maria Navarrete-Muñoz^{1,2}, Marisa Rebagliato², Carmen Iñiguez^{2,3}, Mario Murcia^{2,3}, Alfredo Marco^{2,4}, Ferran Ballester^{2,3} and Jesus Vioque^{1,2}

¹Departamento de Salud Pública, Campus San Juan, Universidad Miguel Hernández, Carretera de Valencia s/n, 03550 San Juan de Alicante, Spain

²CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

³Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP), Valencia, Spain

⁴Hospital La Fe, Valencia, Spain

(Received 10 February 2010 – Revised 10 November 2010 – Accepted 12 November 2010)

Abstract

We examined the relationship between dietary folate intake and periconceptional use of folic acid (FA) supplements, and small for gestational age for weight (SGA W) and height (SGA H). The study is based on 786 Spanish women aged 16 years or above, who attended the first term prenatal population based screening programme (10–13 weeks) at the reference hospital 'La Fe', Valencia, with singleton pregnancy. Periconceptional use of FA supplements was categorised as non users, moderate users (≤ 1 mg/d) and high users (> 1 mg/d). Babies born to mothers who used high doses of FA supplements had a significant reduction in mean birth height compared with babies of non users ($\beta = -0.53$, 95% CI $-0.96, -0.09$). As regards weight, mothers using moderate and high doses of FA supplements had lower birth weight babies for gestational age than non users ($\beta = -22.96$, 95% CI $-101.14, 55.23$; $\beta = -89.72$, 95% CI $-188.64, 9.21$, respectively), although these decreases were not significant. Results from the multivariate logistic regression models showed that high FA supplement users had a higher significant risk for SGA H (OR 5.33, 95% CI 2.08, 13.7), and that users of moderate doses were not associated with a higher risk of either a SGA W or a SGA H baby. In contrast, increased quintiles of the dietary intake of folate were associated with a decreased risk of SGA W (P for trend = 0.002), although no association was observed for SGA H. Our findings suggest that periconceptional use of FA supplements greater than 1 mg/d is associated with decreased birth height and may entail a risk of decreased birth weight.

Key words: Pregnancy; Folic acid; Fetal growth; Birth height

The evidence that folic acid (FA) reduces the risk of neural tube defects^(1–12) has led many national governments to recommend that women should take 0.4 mg of synthetic FA daily periconceptionally for maintaining a healthy diet⁽¹³⁾.

Nowadays, the practice of using FA supplements by pregnant women aims both to prevent congenital malformations and also to correct abnormal folate metabolism or deficiency in order to avoid megaloblastic anaemia and to maintain reproductive health. These have led to distinctively different uses of FA: prenatal; periconceptional; throughout pregnancy⁽¹⁴⁾. There has been increasing interest in the possible effects of FA supplementation during pregnancy on birth weight, low birth weight (birth weight < 2500 g), pre-term delivery (< 37 weeks) and small-for-gestational age (SGA).

Overall, epidemiological studies have suggested that adequate FA during pregnancy promotes fetal growth^(15–21). This has been supported by a population-based study of 6 million Californian births, where small but significant risk reductions were reported for low birth weight (6%) and pre-term delivery (4%) before and after mandatory FA fortification⁽²²⁾. However, other observational studies have not found such associations^(23–25), and a meta-analysis of twenty-two randomised controlled trials found no evidence that FA supplementation after the first trimester had any beneficial effect on mean birth weight and gestational age at delivery. The authors concluded that periconceptional folate use should not be continued through pregnancy⁽²⁶⁾. To our knowledge, only two epidemiological

Abbreviations: FA, folic acid; SGA, small-for-gestational age; SGA-H, small-for-gestational age for height; SGA-W, small-for-gestational age for weight.

* Corresponding author: M. Pastor-Valero, fax +34 96591955; email mpastor@umh.es

studies have specifically studied the relationship between periconceptional use of FA and fetal growth. One double-blind randomised trial showed that preconception use of daily doses of FA supplements increased birth weight and decreased SGA only in babies born after week 42 of pregnancy compared with the non-supplemented group⁽²⁷⁾. In a population-based cohort study, periconceptional use of a low dose of FA supplements was associated with a decreased risk of low birth weight and SGA compared with non-users. The greatest effect was observed on newborns from mothers who started supplementation before conception. Their babies had 68 g higher birth weight compared with the babies of non-users⁽²⁸⁾.

The lack of consistency among studies makes it difficult to draw conclusions about whether or not FA supplementation influences fetal growth. Although folate is safe and almost free of toxicity⁽¹³⁾, several studies have drawn attention to the possible side effects of using higher doses of synthetic FA than those recommended^(29,30). An improvement in the periconceptional use of FA supplements by Spanish pregnant women has been reported in recent years. However, most of these women are apparently using much higher FA supplement doses than recommended^(31,32).

The aim of the present study was to examine the effect of periconceptional FA supplementation use and dietary folate intake on birth weight, small-for-gestational age for weight (SGA-W) and height (SGA-H) in a cohort study of pregnant women in Valencia, Spain.

Methods

Population and study design

The present investigation is part of the Spanish population-based multi-centre cohort study, 'Infancia y Medio Ambiente', which aims to examine the role of diet and environmental factors on fetal growth and infant health until young adulthood in several Spanish cities. The mothers' recruitment and follow-up procedures are described elsewhere^(33–35). In brief, the Spanish health care system includes a standardised and regular screening programme for congenital malformations between the 10th and 13th weeks of gestation. Pregnant women from a well-defined geographic area in the Valencia region were recruited when they attended their first prenatal visit in La Fe Hospital. Women were eligible if they fulfilled the following inclusion criteria: age 16 years or above; singleton pregnancy; no assisted conception; inclusion visit at 10–13 weeks; delivery foreseen at the reference hospital; no communication handicap. From February 2004 to June 2005, 840 of 1563 eligible women were included in the study (54% participation rate). Participants were slightly older with similar educational levels, but they were more likely to be working

than non-participants. The final analyses included 787 women who gave birth to a singleton live infant between May 2004 and February 2006.

The present study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and the study protocols were approved by the Ethics Committee of La Fe Hospital (Valencia, Spain).

Small-for-gestational age

Information on anthropometric measures at birth was obtained from the hospital delivery logs. After birth, the midwife measured birth weight, and birth height was measured during the first 12 h. Gestational age was established based on the last menstruation period. When the difference between the last menstruation period and the first-trimester ultrasound was equal to or greater than 7 d, gestational age was established by ultrasound. In 12.5% of the women, a first-trimester ultrasound of the crown-rump length was used to date gestational age. Birth weight and height were adjusted for sex to correspond to a gestational age of 40 weeks using the residual method. We defined SGA-W or SGA-H as that weight or length below the 10th percentile based on Spanish standardised growth reference charts for both sexes⁽³⁶⁾. Neither SGA-W nor SGA-H could be defined for a newborn whose gestational age (23 weeks) had no percentile value. Pre-term births were defined as babies born at less than 37 weeks. Consequently, the final sample was composed of 786 women who gave birth to a live singleton baby.

Periconceptional folic acid use and folate intake

During their first visit, women were asked the following question: 'In the 3 months prior to becoming pregnant and up to the present, have you taken FA or multivitamins?' Information regarding the date supplement use began, the frequency of use (times/week), dose and brand names of supplements was also collected.

Periconceptional use of FA supplements was defined as any use involving supplements containing FA alone and/or FA from multivitamin supplements, from 3 months before conception up to and including the first month of pregnancy. Women who took FA supplements daily for at least 1 month during the studied period were defined as users of periconceptional FA. Those who never used supplements containing FA during periconception were defined as non-users. Thus, FA supplement users were categorised into moderate users (≤ 1 mg/d, ranging from 0.2 to 0.9 mg/d) and high users (> 1 mg/d, ranging from 2.5 to 10.5 mg/d). Only 5.2% of FA supplement users received it in the form of multivitamin supplements.

Usual dietary folate intake was measured using a modified version of the Harvard FFQ⁽³⁷⁾, previously adapted and validated for a general adult Spanish population^(38,39).

The FFQ had 100 food items to assess usual food and nutrient intakes during the first trimester of pregnancy. Caffeine (mg/d) and alcohol (g/d) intakes were also assessed in the FFQ. Nutrient values were obtained from the US Department of Agriculture food composition tables and other published sources⁽⁴⁰⁾. We asked how often, on average, participants had consumed a particular amount of a specific type of food from the last menstrual period until the time of the interview. We calculated nutrient intakes by multiplying the frequency of consumption for each food item by the nutrient composition of the portion size specified on the FFQ and by adding the total across all foods to obtain a total nutrient intake for each individual. We used the residual method to estimate energy-adjusted values for nutrient intakes⁽³⁷⁾.

Covariates

Information on covariates was obtained from questionnaires completed at personal interview. Covariates considered were maternal age at entry in the study (≤ 29 , 30–34 and ≥ 35 years), years of education (\leq primary school, secondary school and university), country of origin (Spain and other countries), lifestyle variables such as current smoking (yes or no), alcohol consumption (g/d), hours of television viewing during the first trimester and paternal height (in cm) as stated by the mother. Relevant data about past and present medical and obstetric history, including complications relating to the current pregnancy such as gestational hypertension, gestational diabetes, pre-pregnancy BMI, gestational weight gain, planned pregnancy, attendance by private gynaecologist and parity, were also collected. The variable 'medical problems in previous pregnancies' was derived from the information on previous obstetric history, including instances of miscarriage, stillborn offspring, previous pre-term and low-birth-weight births and congenital malformations. We collected information on chronic diseases such as diabetes, high blood pressure, CVD, and allergies, drug use, family medical conditions and vaccinations during pregnancy. Pre-pregnancy BMI was calculated by dividing self-reported weight before pregnancy (in kg) by the square of the self-reported height (in m). Total gestational weight gain was calculated as the product of gestational length (in weeks) and weekly maternal weight gain. The latter was previously adjusted for the last available gestational age to avoid the non-linearity of weight gain during pregnancy. Both BMI and weight gain were further classified following the guidelines of the Institute of Medicine⁽⁴¹⁾. As such, total weight gain was classified according to the recommended total weight-gain ranges for pregnant women, based on pre-pregnancy BMI, as follows: low, from 12.5 to 18 kg for women with a pre-pregnancy BMI $< 19.8 \text{ kg/m}^2$; normal, from 11.5 to 16 kg, for pre-pregnancy BMI of $19.8\text{--}26.0 \text{ kg/m}^2$; high, from 7 to 11.5 kg for pre-pregnancy BMI $> 26.0\text{--}29.0 \text{ kg/m}^2$.

For example, a woman with a pre-pregnancy BMI $< 19.8 \text{ kg/m}^2$ and total weight gain higher than 18 kg was classified as having a high total weight gain.

Statistical analysis

For descriptive purposes, characteristics of periconceptual FA users and non-users were expressed as percentages or means and standard deviations or medians (interquartile ranges). Dietary folate data were treated logarithmically to take into account their skewed distributions and adjusted according to the total energy intake model described by Willett *et al.*⁽³⁷⁾. These standardised values were then categorised into quintiles, with the lowest quintile treated as the reference category. We performed bivariate analyses to determine maternal and infant characteristics associated with periconceptual FA use. ANOVA or the Kruskal–Wallis tests were used to compare means of continuous variables and χ^2 tests for categorical variables. Height of both parents, dietary intake of FA, alcohol consumption and hours of television viewing were included as continuous variables, as they showed a linear relationship.

Logistic regression analysis was used to estimate the independent effect of periconceptual use of FA on the risk of SGA-W (model 1) and SGA-H (model 2), where the reference category was non-users of supplements. We included the FA supplement use and quintiles of dietary folate, together with all potential confounding factors in the same model. We used the likelihood ratio test for the exclusion or inclusion of covariates. All covariates with P values < 0.20 or those reported in the biomedical literature as determinants of fetal growth were retained in the model. Covariates were considered confounders if they changed the estimation of FA use related to either SGA-W or SGA-H by more than 10%. Models were adjusted for maternal age, country of origin, education, dietary intake of FA, gestational diabetes and hypertension, gestational weight gain, parity, planned pregnancy, history of medical problems in previous pregnancies, private gynaecologist and maternal height and paternal height. A P value < 0.05 was considered as significant for the estimate of the effect.

Multiple linear regression analysis was used to estimate the independent associations between continuous birth outcomes (BW and BH) and the use of FA supplements, adjusting for covariates following the same strategy as for dichotomous birth outcomes.

Results

In the present study, 30% of women reported daily periconceptual use of FA supplements (either moderate doses, mean 331 (sd 130) $\mu\text{g/d}$, or high doses, mean 4560 (sd 2013) $\mu\text{g/d}$; $P < 0.01$; Table 1). FA supplement users were slightly older, better educated, mainly Spanish, more likely to be nulliparous, more likely to have planned

Table 1. Characteristics of pregnant women (*n* 786) and their newborns of the Infancia y Medio Ambiente-Valencia cohort study according to the periconceptional use of folic acid (FA) supplements by doses (Mean values, standard deviations, *n* and percentages)

	FA supplement use												<i>P</i> *
	Non-users (<i>n</i> 550)				Moderate (≤ 1 mg/d, <i>n</i> 152)				High (> 1 mg/d, <i>n</i> 84)				
	Mean	SD	<i>n</i>	%	Mean	SD	<i>n</i>	%	Mean	SD	<i>n</i>	%	
Demographics and lifestyles													
Maternal age (years)													
≤ 29			258	46.9			74	48.7			28	33.3	0.140
30–34			206	37.5			53	34.9			42	50.0	
> 35			86	15.6			25	16.4			14	16.7	
Education													
\leq Primary school			202	36.7			51	33.6			14	16.7	< 0.001
Secondary school			241	43.8			52	34.2			42	50.0	
University			107	19.5			49	32.2			28	33.3	
Country of origin													
Spain			470	85.5			141	92.8			83	98.8	< 0.001
Other countries			80	14.5			11	7.2			1	1.2	
Smoking – first trimester, % smokers (missing 7)			145	26.6			33	21.9			16	19.0	0.208
Alcohol – first trimester, % non-drinkers (missing 5)			371	68.1			111	73.0			62	73.8	0.342
TV watching (h/d) (missing 2)			2.4	1.5			2.4	1.5			2.1	1.5	0.195
Pregnancy characteristics													
Gestational diabetes			31	5.6			9	5.9			2	2.4	0.438
Gestational hypertension			16	2.9			8	5.3			2	2.4	0.314
Gestational wt gain (missing 9)													
Normal			197	36.3			60	40.0			30	35.7	0.152
Low			129	23.8			44	29.3			16	19.0	
High			217	40.0			46	30.7			38	45.2	
Planned pregnancy (missing 9)			376	69.2			138	91.4			75	90.4	< 0.001
Private gynaecologist			165	30.0			61	40.1			41	48.8	0.001
Maternal ht (cm)	161.8	6.3			161.8	6.7			164.0	6.0			0.011
Paternal ht (cm)	175.0	7.2			176.4	7.5			177.4	6.5			0.005
Obstetric history													
Parity													
0			285	51.8			95	62.5			54	64.3	0.013
≥ 1			265	48.2			57	37.5			30	35.7	
Medical problems in previous pregnancies†			103	18.7			37	24.3			22	26.2	0.130
Newborn characteristics													
Birth wt‡	3344	417			3282	445			3324	432			0.153
Birth ht‡	50.6	1.8			50.3	1.8			50.2	2.2			0.041
SGA-W§			52	9.5			24	15.8			14	16.7	0.027
SGA-H§			25	4.6			11	7.2			9	10.7	0.052
Gestational age	39.6	1.9			39.3	1.6			39.6	1.8			0.164
Sex (newborn)													
Female			257	46.7			76	50.0			37	44.0	0.651
Male			293	53.3			76	50.0			47	56.0	
Folic acid status													
Dietary folate intake (μ g/d) (missing 5)	305	102			295	92			315	100			0.324
Energy intake (kJ/d) (missing 5)	9673.41	2510.4			9526.97	2380.69			9439.10	2250.99			0.634
Folic acid intake from supplements (μ g/d)	0				331	130			4560	2013			< 0.001

TV, television; SGA-W, small-for-gestational age for weight; SGA-H, small-for-gestational age for height.
 * *P* value from the χ^2 test and ANOVA.
 † Spontaneous abortion, stillborn offspring, previous pre-term and low-birth-weight births and congenital malformations.
 ‡ Birth weight and height standardised for sex and gestational age using the residual method.
 § Newborns whose weight and/or height were below the 10th percentile according to the Spanish growth reference charts.

the pregnancy, more often attended by a private gynaecologist, more likely to give birth to babies with a lower birth weight and height and had more SGA-W and SGA-H babies than non-users. Users and non-users were similar in alcohol consumption, smoking, hours of television viewing, prevalence of gestational diabetes and hypertension, and dietary intake of folate.

Mean birth weight and height of babies adjusted for gestational age and sex were lowest for women using high doses of supplements (3324 (SD 432)g and 50.2 (SD 2.2)cm, respectively) compared with those for moderate dose users and non-users (Table 2). However, increasing quintiles of dietary folate were associated with higher birth weight and height, although mean weight and mean height for the fourth quartile were somewhat lower than those for the third quintile. β -Coefficients from the multiple linear regression analysis showed that babies of mothers who used high doses of FA supplements had a significant reduction in mean birth height of 0.5 cm compared with babies of non-users ($\beta = -0.53$, 95% CI -0.96 , -0.09). As regards weight, mothers using moderate and high doses of FA supplements had lower-birth-weight babies for gestational age than non-users ($\beta = -22.96$, 95% CI -101.14 ,

55.23; $\beta = -89.72$, 95% CI -188.64 , 9.21, respectively), although these decreases were not significant.

Similarly, results from the multivariate logistic regression models (Table 3) showed that high FA supplement users showed a higher significant risk for SGA-H (OR 5.33; 95% CI 2.08, 13.7) than non-users. An association for SGA-W (OR 2.05, 95% CI 0.98, 4.28), which was not-significant, was also observed. On the other hand, users of moderate doses were not associated with a higher risk of either a SGA-W or a SGA-H baby, whereas increasing quintiles of dietary folate were associated with decreasing risk for SGA-W, with maximum protection from intakes above 245.4 $\mu\text{g}/\text{d}$ (P for trend=0.002). However, no association was observed for SGA-H. The logistic regression model for height (Table 3) was repeated using fetal growth restriction for height as the dependent variable instead of SGA-H (results not shown). Briefly, fetal growth restriction was estimated based on constitutional growth potential to differ growth-restricted newborns from constitutionally small ones. To define fetal growth restriction, we predicted each anthropometric measure at birth (i.e. birth height) using a customised model, taking into account parental (maternal preconception weight, height, and parity

Table 2. Multiple linear regression between periconceptional use of folic acid (FA) supplements and weight and height at birth adjusted for gestational age in the Infancia y Medio Ambiente-Valencia cohort study, 2004–6 (Mean values, standard deviations, β and 95% confidence intervals)

	Total	Mean	SD	β^*	95% CI
Birth wt†					
FA supplement use					
Non-users	550	3344	417	–	–
Moderate ≤ 1 mg/d	152	3282	445	22.96	101.14, 55.23
High > 1 mg	84	3324	432	89.72	188.64, 9.21
P_{\ddagger}	0.087				
Quintiles of dietary folate intake§					
≤ 211.1	155	3207	402	–	–
211.2–245.4	157	3306	449	98.96	6.37, 191.56
245.5–283.7	156	3383	424	155.07	60.94, 249.20
283.8–332.0	157	3338	389	126.88	32.38, 221.38
> 332	156	3388	468	168.50	72.62, 264.39
P_{\ddagger}	0.001				
Birth ht††					
FA supplement use					
Non-users	550	50.6	1.8	–	–
Moderate ≤ 1 mg/d	152	50.3	1.8	0.24	0.59, 0.10
High > 1 mg	84	50.2	2.2	0.53	0.96, 0.09
P_{\ddagger}	0.012				
Quintiles of dietary folate intake§					
≤ 211.1	155	50.3	1.7	–	–
211.2–245.4	157	50.4	2.1	0.02	0.39, 0.43
245.5–283.7	156	50.8	1.91	0.40	0.02, 0.81
283.8–332.0	157	50.6	1.6	0.23	0.18, 0.81
> 332	156	50.7	1.8	0.29	0.13, 0.71
P_{\ddagger}	0.108				

* β -Coefficients and 95% CI from multiple regression adjusted for maternal age (≤ 29 , 30–34 and ≥ 35 years), country of origin (Spain and other countries), education (\leq primary school, secondary school and university), energy intake (kJ), smoking (no or yes), alcohol intake (no or yes), television viewing (h/d), gestational diabetes (no or yes), transient hypertension (no or yes), gestational weight gain (normal, low and high), parity (0 and ≥ 1), planned pregnancy (no or yes), history of medical problems in previous pregnancies (no or yes), private gynaecologist (no or yes), maternal height (cm) and paternal height (cm).
† Birth weight (g) and height (cm) adjusted for gestational age and sex.
‡ P value for linear trends examined using likelihood ratio tests.
§ Quintiles of dietary folate intake ($\mu\text{g}/\text{d}$) adjusted by total energy intake.

Table 3. Multiple logistic regression analysis between the periconceptual use of folic acid (FA) supplements and the risk of small-for-gestational age for weight and height (SGA-W and SGA-H) in the Infancia y Medio Ambiente-Valencia cohort study, 2004–2006
(*n*, percentages, odds ratios and 95% confidence intervals)

	Total	SGA*		OR adjusted†	95% CI	P‡
		<i>n</i>	%			
Model 1						
SGA-W*						
FA supplement use						
Non-users	550	52	9.5	1.00		0.047
Moderate ≤ 1 mg/d	152	24	15.8	1.38	0.76, 2.51	
High > 1 mg/d	84	14	16.7	2.05	0.98, 4.28	
Quintiles of dietary folate intake§						
≤ 211.1	155	26	16.8	1.00		0.002
211.2–245.4	157	23	14.6	0.86	0.44, 1.68	
245.5–283.7	156	13	8.3	0.39	0.18, 0.85	
283.8–332.0	157	9	6.4	0.21	0.09, 0.50	
> 332	156	18	11.5	0.48	0.22, 1.02	
Model 2						
SGA-H*						
FA supplement use						
Non-users	550	25	4.6	1.00		0.001
Moderate ≤ 1 mg/d	152	11	7.2	1.93	0.84, 4.44	
High > 1 mg/d	84	9	10.7	5.33	2.08, 13.7	
Quintiles of dietary folate intake§						
≤ 211.1	155	10	6.5	1.00		0.110
211.2–245.4	157	13	8.3	1.33	0.53, 3.33	
245.5–283.7	156	9	5.8	1.00	0.37, 2.72	
283.8–332.0	157	9	5.7	0.96	0.35, 2.68	
> 332	156	4	2.6	0.35	0.10, 1.24	

* Newborns whose weight and/or height were below the 10th percentile according to the Spanish growth reference charts.

† OR adjusted for maternal age (≤ 29 , 30–34 and ≥ 35 years), country of origin (Spain and other countries), education (\leq primary school, secondary school and university), energy intake (kJ), smoking (no or yes), alcohol intake (no or yes), television viewing (h/d), gestational diabetes (no or yes), transient hypertension (no or yes), gestational weight gain (normal, low and high), parity (0 and ≥ 1), planned pregnancy (no or yes), history of medical problems in previous pregnancies (no or yes), private gynaecologist (no or yes), maternal height (cm) and paternal height (cm).

‡ *P* value for linear trends examined using likelihood ratio tests.

§ Quintiles of dietary folate intake (μ g/d) adjusted by total energy intake.

and paternal height) and newborn variables (sex and gestational age). Subsequently, we classified fetal growth restriction as those newborns below the 10th percentile of the predicted birth-height distribution⁽⁴¹⁾. It was observed that although the effect of high doses of FA supplements on fetal growth restriction for length was smaller compared with the effect on SGA-H, this effect was still strong and statistically significant (OR 3.18, 95% CI 1.47, 6.86; OR 5.33, 95% CI 2.08, 13.7, respectively).

Discussion

The present study found that pregnant women who used high periconceptual doses of FA supplements had a significantly higher risk of having a SGA-H baby. Those mothers taking moderate periconceptual doses of FA supplements were not at risk of having either a SGA-W or a SGA-H baby. In contrast, increasing quintiles of dietary folate showed a significant reduction in the risk of SGA-W, but no association was found for SGA-H.

Increased risk of SGA with the intake of high doses of FA supplements has not been previously reported, either when examining the use of FA supplements during the

whole pregnancy^(19, 21,23,24,26) or when studying the periconceptual use of FA on fetal growth^(27,28). In the present study, the associations between dietary folate intake and high doses of supplements of FA with birth anthropometry were unexpected and opposite. While dietary folate is the naturally occurring water-soluble vitamin B₉ form found in fresh foods, FA is the synthetic oxidised form, which must be converted to tetrahydrofolate by dihydrofolate reductase in the human liver to be biologically active⁽⁴²⁾. The activity of dihydrofolate reductase becomes saturated when FA is consumed at levels higher than the tolerable upper intake level for FA (1 mg/d for adults), leading to a considerably increased exposure to unmetabolised FA. In fact, it seems that doses above 0.4 mg/d result in the appearance of unmetabolised FA⁽⁴³⁾. Concerns have been expressed that high doses of FA supplements (> 1 mg/d) and the presence of plasma unmetabolised FA may exacerbate some pre-existing cancers or the progression of precancerous lesions^(44,45). Methyl donors such as FA are essential for the methylation of DNA required to regulate gene expression, transcription and stability of DNA. It has been suggested that increased methylation of insulin-like growth factor 2-imprinted gene

is associated with decreased birth weight, since it may play a central role in matching the placental nutrient supply to the fetal nutrient demands for growth^(42,46). The mechanism underlying the adverse effects of the use of high doses of FA, unmetabolised circulating FA and reproductive health is unclear, but it seems that methyl donors can have a profound impact upon reproductive health through an epigenetic mechanism⁽⁴⁷⁾.

The prevalence of preconceptional use of FA supplements in the present study (18.8%) is similar to the latest trends found for Spanish pregnant women (17.37%) reported for the period 1991–2004⁽³²⁾. However, the prevalent use of high doses of FA supplements (1–5 mg/d) has been found to be higher (57.01%) than was observed in the present study (36.9%). Given these trends on high dose supplementation practices, if the associations observed in the present study are proved true, one would expect a greater effect of periconceptional FA supplements on small-for-gestational age at the population level. On the other hand, we found that pregnant women with the highest dietary intake of folate (>245 µg/d) had a 60% decreased risk of having SGA-W babies compared with women with the lowest folate intake (first quintile <211 µg/d), and this was independent of FA supplement use. In fact, high vegetable intake (the main food source of folate) was found to be significantly associated with higher weight and length at birth in our population⁽³⁵⁾. Similar results were found in a prospective US study showing that women with the lowest FA intake (≤240 µg/d) had a twofold risk of having a low-birth-weight baby⁽¹⁶⁾.

Reverse causality might explain our findings. There was no specific question asking why women in the present study used the FA supplements. To explore whether reverse causation or potential indication bias might have occurred (either self-selected use of FA or prescribed by health professionals), we repeated the statistical analysis excluding the 162 women who reported any medical complication in previous pregnancies. Results remained unchanged, and consequently we believe that reverse causality might not have occurred.

Previous studies have shown that maternal exposure to FA antagonists in the 1-year period before delivery, such as anti-epileptic drugs, drugs used in mood disorders, in urinary tract infections and in CVD might be associated with fetal growth restriction⁽⁴⁸⁾. In the present study, there was no information about medication use in the year before delivery, but the relationship between the presence of chronic diseases including CVD, depression, urinary tract infection, Crohn's disease and other infections during pregnancy and SGA was examined. No association was observed between any of these diseases and SGA. Besides the possibility of residual confounding, several other potential limitations may have affected our findings. The 54% participation rate may have affected the external validity of the present study, but generalising the results to the whole population of pregnant women in the Valencia

region was beyond the scope of the present study. Selective participation of pregnant women may not be ruled out completely if the decision to participate had been related to the risk factors under study. In cohort studies, the decision to participate cannot be based upon future outcomes⁽⁴⁹⁾, but the decision to participate may correlate with social, educational and health conditions, which may be associated with risk factors for birth outcomes⁽⁵⁰⁾. In the present study, participants and non-participants had similar various sociodemographic characteristics except for working status and age, with a higher proportion of working women and slightly higher mean age among participants (mean age 30.2 *v.* 29.8 years, respectively). The use of a questionnaire to assess FA supplementation may have led to the misclassification of exposure, despite the clear question concerning supplements. We were unable to validate self-reported FA supplement use against serum folate levels, a more reliable index of human folate status. The fact that we asked for FA supplementation use in early pregnancy may have minimised a possible recall bias. Due to the prospective design, self-reported supplement use was not influenced by the newborn birth weight or height, and if there was a misclassification, it is likely to have been non-differential. Finally, the use of an FFQ may have led to the misclassification of dietary folate intake. Folate was not key to the design of the present FFQ, but results from the validation study carried out within the same population of pregnant women showed good correlation coefficient between total folate intake and serum folate in the third month of pregnancy (r 0.50, P <0.01; J Vioque, EM Navarrete-Muñoz, D Gimenez, M Rebagliato, F Ballester, R Ramón, M Murcia, M García de la Hera and C Iñiguez, unpublished results). The main food sources of folate in our questionnaire were presented either as separate food items (wheat bread, whole wheat bread, bananas, oranges and spinach) or in food groups with similar folate content (broccoli, Brussels sprouts and cabbage, or lettuce, endive or chicory). For these reasons, and despite its limitations, we believe that the FFQ used in the present study was adequate to discriminate high from low consumers of folate intake.

The present study has several strengths. It has a prospective design with many high-quality measurements performed on mothers and newborns, which increases the accuracy of our effect estimates. Trained interviewers prospectively collected the data, and few participants were lost to follow-up (4%), providing internal validity to our findings. The effect estimates persisted after adjustment for all the confounders identified along with other important determinants of birth weight and height.

In conclusion, it has yet to be elucidated whether FA might be related to DNA methylation changes and decreased fetal growth. Although observational studies cannot prove metabolic mechanisms, a randomised controlled trial is neither ethical nor feasible. Given the

current increasing Spanish trends regarding high doses of FA supplements, large population-based cohort studies might be one of the few ways to investigate this question further. These studies should include detailed information on FA supplement use, such as medical indication or self-supplementation use, and examine the effect of FA supplements on DNA methylation.

Acknowledgements

The present study was supported by Instituto de Salud Carlos III (Madrid, Spain; Red Infancia y Medio Ambiente G03/176 and CB06/02/0041), FIS-FEDER (Valencia, Spain; 03/1615, 04/1509, 04/1112, 06/1213 and 07/0314), Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2002-03508) and Conselleria de Sanitat Generalitat Valenciana (012/2009). M. P.-V. conducted the data analysis, interpreted the results, drafted the manuscript and completed critical revisions. E. M. N.-M. conducted the data analysis and interpreted the results. C. I. and M. M. assisted with data analysis and critically reviewed the manuscript. M. R., F. B. and J. V. were responsible for the conception and design of the study, and supervised the data collection and critically reviewed the manuscript. A. M. supervised the data collection and helped with manuscript preparation. The authors would particularly like to thank all the women involved for their generous collaboration. We are most grateful to Sonia Hernández-Díaz from the Department of Epidemiology, Harvard School of Public Health, for scientific advice. We also want to thank to the fieldworkers Amparo Quiles, Amparo Cases, Manoli Garcia de la Hera, Daniel Gimenez-Monzo and María Dolores Climent. We appreciate the English revision undertaken by Mr Jonathan Whitehead. The authors declare no conflict of interest.

References

1. Laurence K, James N, Miller M, *et al.* (1980) Increased risk of recurrence of pregnancies complicated by fetal neural tube defects in mothers receiving poor diets, and possible benefit of dietary counselling. *Br Med J* **281**, 1592–1594.
2. Laurence K, James N, Miller M, *et al.* (1981) Double blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural tube defects. *Br Med J* **282**, 1509–1511.
3. Mulinare J, Cordero J, Erickson J, *et al.* (1988) Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects. *JAMA* **260**, 3141–3145.
4. Milunsky A, Jick H, Jick S, *et al.* (1989) Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA* **262**, 2847–2852.
5. Bower C & Stanley F (1989) Dietary folate as a risk factor for neural tube defects: evidence from a case control study in Western Australia. *Med J Aust* **150**, 613–619.
6. Mills J, Rhoads G, Simpson J, *et al.* (1989) The absence of a relation between the periconceptional use of vitamins and neural tube defects. National Institute of Child Health and Human Development Neural Tube Defects Study Group. *N Engl J Med* **321**, 430–435.
7. Vergel R, Sanchez L, Heredero B, *et al.* (1990) Primary prevention of neural tube defects with folic acid supplementation: Cuban experience. *Prenat Diagn* **10**, 149–152.
8. MRC Vitamin Study Research Group (1991) Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* **338**, 131–137.
9. Czeizel A & Dudás I (1992) Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* **327**, 1832–1835.
10. Czeizel A (1993) Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation. *BMJ* **306**, 1645–1648.
11. Werler M, Shapiro S & Mitchell A (1993) Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *JAMA* **269**, 1257–1261.
12. Shaw G, Schaffer D, Velie E, *et al.* (1995) Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology* **6**, 219–226.
13. Bichholzer M, Tönz O & Zimmermann R (2006) Folic acid: a public health challenge. *Lancet* **367**, 1352–1361.
14. Tamura T & Picciano M (2006) Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr* **83**, 993–1016.
15. Baumslag NET & Metz J (1970) Reduction of incidence of prematurity by folic acid supplementation in pregnancy. *Br Med J* **1**, 16–17.
16. Rolschau JDJ & Kristoffersen K (1979) Folic acid supplement and intrauterine growth. *Acta Obstet Gynecol Scand* **58**, 343–346.
17. Goldenberg R, Tamura T, Cliver S, *et al.* (1992) Serum folate and fetal growth retardation: a matter of compliance? *Obstet Gynecol* **79**, 719–722.
18. Scholl T, Hediger M & Schall J (1996) Dietary and serum folate: their influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr* **63**, 520–525.
19. Neggens Y, Goldenberg R & Tamura T (1997) The relationship between maternal dietary intake and infant birthweight. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* **165**, 71–75.
20. Mitchell E, Robinson E, Clark P, *et al.* (2004) Maternal nutritional risk factors for small for gestational age babies in a developed country: a case control study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* **89**, 431–435.
21. van Eijsden M, Smits L & van der Wal M (2008) Association between short interpregnancy intervals and term birth weight: the role of folate depletion. *Am J Clin Nutr* **88**, 147–153.
22. Shaw G, Carmichael S, Nelson V, *et al.* (2004) Occurrence of low birthweight and preterm delivery among California infants before and after compulsory food fortification with folic acid. *Public Health Rep* **119**, 170–173.
23. Shaw G, Liberman R, Todoroff K, *et al.* (1997) Low birth weight, preterm delivery, and periconceptional vitamin use. *J Pediatr* **130**, 1013–1014.
24. Mathews F, Yudkin P & Neil A (1999) Influence of maternal nutrition on outcome of pregnancy: prospective cohort study. *BMJ* **319**, 339–343.
25. Rondo P & Tomkins A (2000) Folate and intrauterine growth retardation. *Ann Trop Paediatr* **20**, 253–258.
26. Charles D, Ness A & Campbell D (2005) Folic acid supplements in pregnancy and birth outcome: re analysis of a large randomised controlled trial and update of Cochrane review. *Paediatr Perinat Epidemiol* **19**, 112–124.
27. Rolschau J, Kristoffersen K, Ulrich MT, *et al.* (1999) The influence of folic acid supplement on the outcome of pregnancies in the county of Funen in Denmark. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **87**, 105–110, discussion 3–4.
28. Timmermans S, Jaddoe V, Hofman A, *et al.* (2009) Periconception folic acid supplementation, fetal growth

- and the risks of low birth weight and preterm birth: the Generation R Study. *Br J Nutr* **102**, 777–785.
29. Lucock M (2004) Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *BMJ* **328**, 211–214.
 30. Lucock M & Yates Z (2005) Folic acid – vitamin and panacea or genetic time bomb? *Nat Rev Genet* **6**, 235–240.
 31. Martínez Frías M, Rodríguez Pinilla E & Bermejo E (2003) Analysis of the Spanish situation regarding folic acid/calcic folinate consumption for birth defects prevention. *Med Clin* **121**, 772–775.
 32. Martínez Frías M (2007) Folic acid dose in the prevention of congenital defects. *Med Clin* **128**, 609–616.
 33. Ribas Fitó N, Ramón R, Ballester F, *et al.* (2006) Child health and the environment: the INMA Spanish Study. *Paediatr Perinat Epidemiol* **20**, 403–410.
 34. Ramón R, Ballester F, Aguinagalde X, *et al.* (2009) Fish consumption during pregnancy, prenatal mercury exposure, and anthropometric measures at birth in a prospective mother–infant cohort study in Spain. *Am J Clin Nutr* **90**, 1047–1055.
 35. Ramón R, Ballester F, Iñiguez C, *et al.* (2009) Vegetable but not fruit intake during pregnancy is associated with newborn anthropometric measures. *J Nutr* **139**, 561–567.
 36. Carrascosa A, Yeste D, Copil A, *et al.* (2004) Secular growth changes. Weight, height and body mass index values in infant, children, adolescent and young adults from Barcelona population. *Med Clin* **123**, 445–451.
 37. Willett W, Sampson L, Stampfer M, *et al.* (1985) Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Am J Epidemiol* **122**, 51–65.
 38. Vioque J (2006) Validez de la evaluación de la ingesta dietética (Validity of dietary intake assessment). In *Nutrición y Salud Pública Métodos, Bases Científicas y Aplicaciones (Nutrition and Public Health Methods, Scientific Bases and Applications)*, pp. 199–210 [LA Serra Manjem and J Aranceta Bartrina, editors]. Barcelona: Masson Elsevier.
 39. Vioque J, Weinbrenner T, Asensio L, *et al.* (2007) Plasma concentrations of carotenoids and vitamin C are better correlated with dietary intake in normal weight than overweight and obese elderly subjects. *Br J Nutr* **97**, 977–986.
 40. US Department of Agriculture & Agricultural Research Service (2007) USDA National Nutrient Database for Standards Reference, Release 20. <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/hdl41>
 41. Rodríguez Bernal CL, Rebagliato M, Iñiguez C, *et al.* (2010) Diet quality in early pregnancy and its effects on fetal growth outcomes: the Infancia y Medio Ambiente (Child hood and Environment) Mother and Child Cohort Study in Spain. *Am J Clin Nutr* **91**, 1659–1666.
 42. Bailey S & Ayling J (2009) The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15424–15429.
 43. Sweeney M, Staines A, Daly L, *et al.* (2009) Persistent circulating unmetabolised folic acid in a setting of liberal voluntary folic acid fortification. Implications for further mandatory fortification? *BMC Public Health* **9**, 295.
 44. Cole B, Baron J, Sandler R, *et al.* (2007) Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA* **297**, 2351–2359.
 45. Figueiredo J, Grau M, Haile R, *et al.* (2009) Folic acid and risk of prostate cancer: results from a randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst* **101**, 432–435.
 46. Steegers Theunissen R, Obermann Borst S, Kremer D, *et al.* (2009) Periconceptional maternal folic acid use of 400 microg per day is related to increased methylation of the IGF2 gene in the very young child. *PLoS One* **16**, e7845.
 47. Zeisel S (2009) Importance of methyl donors during reproduction. *Am J Clin Nutr* **89**, 673S–677S.
 48. Wen S, Zhou J, Yang Q, *et al.* (2008) Maternal exposure to folic acid antagonists and placenta mediated adverse pregnancy outcomes. *CMAJ* **179**, 1263–1268.
 49. Hennekens CH & Buring JE (1987) *Epidemiology in Medicine*. Boston, MA: Little, Brown and Co.
 50. Hernán M, Hernández Díaz S & Robins J (2004) A structural approach to selection bias. *Epidemiology* **15**, 615–625.

Cada uno de los artículos que forman el núcleo de esta tesis incluye un apartado de discusión donde se han descrito con detalle los principales hallazgos, la consistencia o no con otros estudios disponibles y los posibles mecanismos biológicos que pueden justificar nuestra hipótesis de partida y los hallazgos encontrados. Hacemos una presentación y discusión de algunos de los resultados más relevantes que hemos encontrado.

Los principales hallazgos del primer artículo muestran que la ingesta de folato es insuficiente para cumplir las recomendaciones de tomar 400 $\mu\text{g}/\text{d}$ de suplementos de AF desde la preconcepción al mes 3 y de tomar 600 $\mu\text{g}/\text{d}$ de ingesta total (dieta más suplementos) durante todo el embarazo. Asimismo la suplementación con ácido fólico solo resuelve en parte el problema, ya que alrededor de un 80% de las mujeres embarazadas no alcanza la recomendación de 600 $\mu\text{g}/\text{d}$ al añadir a su ingesta la suplementación en todos los meses de embarazo. Es más el 2/3 de las que se mujeres que refieren suplementarse en todo el embarazo lo hacen en exceso, superando la UL de 1000 $\mu\text{g}/\text{d}$. El ser no española, de bajo nivel de estudios, fumadora, no haber planificado el embarazo, no haber visitado al ginecólogo privado, haber tenido hijos y no haber tenido antecedentes médicos previos, se asoció con un mayor incumplimiento de la IR ($\geq 600 \mu\text{g}/\text{d}$).

Los hallazgos del segundo artículo revelaron que las madres usuarias de dosis mayores de 1mg/día de AF mostraron un aumento de riesgo de SGA-W-OR=2.05 (0.98, 4.28) y de SGA-H-OR=5.33 (2.08, 13.7), en comparación con las no usuarias. Las madres que usaban dosis moderadas de suplementos ($\leq 1 \text{ mg}/\text{día}$) mostraron una asociación más débil que no alcanzó significancia estadística SGA-W-OR =1.38 (0.76-2.51), SGA-H-OR =1.93 (0.84-4.44). En contraste, el incremento en los quintiles de dieta se asoció con un decrecimiento significativo del riesgo de SGA-W, pero no se encontró una asociación clara entre dieta y SGA-H.

En el primer artículo, examinamos los patrones de suplementación de AF y de ingesta de F durante el embarazo. En él observamos que el aporte dietético de F, a pesar de su ubicación en un área mediterránea, es similar a las encontrada en otros estudios Europeos y Españoles (Arkkola *et al.* 2006, Mouratidou *et al.* 2006, Pinto *et al.* 2009, Roza *et al.* 2009, Irlés Rocamora *et al.* 2003, Arija *et al.* 2004) e inferior a la estimada en

estudios previos realizados con mujeres en edad fértil y embarazadas de la misma área geográfica (Vioque *et al.* 2000, Cárcel *et al.* 2005).

Asimismo, a pesar de las recomendaciones existentes solo una de cada 5 embarazadas reconoció haber tomado suplementos de AF preconcepción. Esta proporción ha sido superior a la observada en estudios previos (Gilbert *et al.* 2000, Gutierrez *et al.* 2003), y similar a la estimada en otros estudios recientes en Portugal y en el Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (Martínez-Frías *et al.* 2003, Martínez-Frías & ECEM 2007), pero sigue siendo inferior a la observada en otros países europeos como Inglaterra (26.4%) y Holanda (27.6%) (Roza *et al.* 2009, Mouratidou *et al.* 2006). La menor proporción de uso de suplementos observada en nuestro estudio podría deberse en parte a que un 23,5% de los embarazos eran no planificados e incluso a que muchas mujeres no habrían conocido su embarazo incluso hasta en 2º y 3º mes de embarazo, lo que debería tomarse en cuenta a la hora de hacer comparaciones entre países y establecer estrategias para mejorar la ingesta de AF en preconcepción.

Junto al uso insuficiente de suplementos de AF en preconcepción, hemos observado una gran variabilidad en las dosis y tipo de suplementos, hallazgo también señalado en estudios previos (Gilbert *et al.* 2000, García Carballo *et al.* 2003). En este sentido, llama la atención que hasta el 30% de las mujeres que se suplementan superaban el límite superior tolerable (1 mg/d) desde la preconcepción hasta el 2º mes de embarazo. Una posible explicación de ello podría ser que lo hiciera por prescripción médica, por ejemplo por haber tenido antecedentes previos de malformaciones, pero sin embargo sólo un 2.2% de las mujeres declararon haber tenido este tipo de antecedentes. Otra posible justificación para la ingesta de esas dosis excesivas de AF a partir del 2º mes podría ser la preinscripción de preparados de levofolinato o folinato cálcico para intentar recuperar más rápidamente un posible déficit al no haberse iniciado la suplementación en preconcepción; no obstante, solo un 2% de las mujeres tomaron este tipo de suplementos supuestamente de absorción más eficiente y la mayoría de las dosis excesivas se alcanzaron con preparados de AF específico a dosis altas o con una combinación de más de un tipo de suplementos.

Teniendo en cuenta estos patrones de suplementación con altas dosis de AF, si la asociación observada en el presente estudio fuera cierta, cabría esperar un mayor efecto a nivel poblacional entre el uso de los suplementos de AF y el crecimiento fetal. Otra posible explicación de los hallazgos encontrados es que al utilizar cuestionarios para evaluar la

ingesta tanto de F como de AF nos haya llevado a una clasificación errónea de la exposición, a pesar de la clara pregunta sobre suplementos.

En los últimos años, cada vez son más frecuentes los estudios que han examinado la relación entre el crecimiento fetal y estado de folato (Tamura & Picciano 2006). Sin embargo, un incremento del riesgo de pequeño para la edad gestacional para peso y talla con altas dosis de AF no ha sido previamente mostrado, ni en los pocos estudios que examinan todo el embarazo ni en aquellos que se centran en la etapa preconcepcional (Neggers *et al.* 1997, Mitchell *et al.* 2004, van Eijdsden *et al.* 2008, Shaw *et al.* 1997, Mathews *et al.* 1999, Charles *et al.* 2005, Rolschau *et al.* 1999, Timmermans *et al.* 2009). La falta de consistencia en los hallazgos encontrados sobre el estado de folato y el crecimiento fetal se deben a varios factores entre los que cabría destacar el pequeño tamaño muestral de la mayoría de estudios, cuestiones metodológicas, como el tiempo de exposición, falta de control o ajuste por posibles factores de confusión y la variación de las características poblacionales y el estado nutricional.

En el artículo 2, donde examinamos la asociación entre ingesta de F de la dieta y altas dosis de suplementación de AF con el riesgo de recién nacido pequeño para la edad gestacional, encontramos asociaciones que no se habían encontrado previamente en la literatura y que podemos considerar sorprendentes. La asociación inversa (protectora) encontrada para la ingesta de folato de la dieta y la de mayor riesgo para la ingesta de altas dosis de suplementos de AF puede deberse a la forma bioquímica de ambos. Como ya fue expuesto en la introducción, mientras que el F es la forma natural, el AF es la forma sintética que se debe convertir a tetrahidrofolato por la dihidrofolato reductasa (DHFR) en el hígado humano. La actividad de DHFR se satura a niveles superiores al límite superior tolerable de ingesta de AF (1 mg/día) pudiendo provocar una exposición mayor a AF no metabolizado. De hecho, parece probable que al ingerir dosis de AF superiores a la recomendación (0.4 mg/d) ya podríamos encontrar una no metabolización del AF (Sweeney *et al.* 2009). Recientemente son varias las publicaciones que han señalado un posible efecto negativo del uso de altas dosis de suplementos de AF (>1 mg/d) y que podría deberse la presencia en el plasma del AF no metabolizado (Whitrow *et al.* 2009). En este sentido se ha postulado que estos niveles excesivos pueden exacerbar algunos cánceres preexistentes o la progresión de lesiones de precancerígenas (Cole *et al.* 2007, Figueiredo *et al.* 2009).

Además, el AF es esencial en la metilación del ADN por ser un donador de metilo requerido para regular la expresión genética, la transcripción y la estabilidad del ADN. Algunos investigadores han sugerido que un incremento en la metilación del gen IFG2 está asociado con la disminución del peso al nacimiento, ya que puede jugar un papel importante en la adecuación de la demanda de nutrientes en la placenta para el buen crecimiento del feto (Bailey & Ayling 2009, Steegers-Theunissen *et al.* 2009). El mecanismo subyacente de cómo las altas dosis de AF no metabolizado circulante y sus efectos adversos en la salud reproductiva no están claros pero parece ser que el donante de metilo puede tener un profundo impacto sobre la salud reproductiva a través de los mecanismos epigenéticos (Zeisel 2009).

Otro de los hechos que podría explicar nuestros resultados es que los patrones de suplementación de AF y de ingesta de F fueran muy diferentes a los mostrados en otros estudios. En España al igual que en otros países Europeos, se recomienda que toda mujer que se vaya a quedarse embarazada siga una dieta variada y rica en este nutriente junto al aporte desde 2-3 meses antes de quedarse embarazada de 0.4 mg/d de suplementos de AF sintético para reducir el riesgo de DTN y otras malformaciones fetales (MRC Vitamin Study Research Group 1991, Eichholzer *et al.* 2006).

Por último, en el anexo I, mostramos resultados en fase preliminar respecto a la reproducibilidad y validez (bioquímica) del CFA que hemos utilizado para evaluar la dieta en las embarazadas. En general, los resultados son muy satisfactorios, ya que observamos una aceptablemente buena correlación entre folato sérico e ingesta de F más AF ajustado por calorías totales (r de Pearson=0.532), similares a las observadas en otro estudio (Mikkelsen *et al.* 2006) aunque en este estudio, para medir las concentraciones plasmáticas se utiliza el folato eritrocitario que es un marcador menos sensible que el folato sérico. El folato sérico refleja la ingesta reciente de F mientras que el eritrocitario refleja mejor la ingesta a largo plazo (Bailey 1990).

Una posible limitación a la hora de comparar las correlaciones observadas para nuestro CFA con otros estudios es el método de referencia utilizado para validar el CFA. Nosotros no hemos utilizado como método de referencia recordatorios de Registros de dieta o Recordatorios de 24H, sin embargo las concentraciones plasmáticas proporcionan una medida objetiva que puede estar sujeta a menos error que la ingesta de AF y además los errores entre las estimaciones de los dos métodos, el F sérico y el F estimado mediante

CFA , son independientes (Willett 1998, Bingham 2002). Además los recordatorios de 24H no contemplan el uso de suplementos en un período muy sensible como es el embarazo.

Por último, la escasez de publicaciones que hayan validado CFA considerando la ingesta de AF de suplementos, dificulta la posibilidad de hacer comparaciones de nuestros hallazgos respecto a la validez del CFA. A pesar de ello, podemos considerar nuestro CFA junto a las preguntas de suplementos como un instrumento con una suficiente reproducibilidad y validez y por tanto útil para medir la ingesta de F y AF.

Limitaciones generales del estudio

El estudio de cohorte INMA es prospectivo y su principal interés es el de encontrar asociaciones. No obstante al tener también un carácter poblacional puede ofrecer estimaciones que pudieran ser extrapolables a población general. En este sentido, la baja tasa de participación del 54%, podría limitar la generalización de resultados, especialmente las estimaciones de tipo descriptivo como prevalencias o ingestas medias. Sin embargo, cuando se compararon las características sociodemográficas entre participantes y no de nuestro estudio, no se encontraron diferencias relevantes y solo se observaron algunas diferencias significativas para algunas variables de carácter menor como por ejemplo situación laboral y la edad (Ramón *et al.* 2009), descartándose un impacto importante si lo hubiera para la posible validez externa de los resultados.

Respecto a la fiabilidad de la evaluación dietética de F y de suplementos de AF, es posible que se haya podido producir algún tipo de error en la estimación absoluta de este nutriente. Si se ha producido es muy probable que sea de tipo no diferencial, y por tanto su repercusión sería hacia la nulidad de asociaciones. Sin embargo, la buena correlación encontrada entre la ingesta total de este nutriente y el folato sérico apoyan la correcta clasificación entre altos consumidores de AF, con correlaciones similares a las observadas en otros estudios españoles (Irles Rocamora *et al.* 2003, Arijá *et al.* 2004). Por otra parte, el hallazgo de asociaciones significativas entre estimaciones de ingesta de F y AF y ciertas variables antropométricas al nacer harían que si hubiera clasificación errónea no diferencial, los efectos reales serían incluso mayor que los observados.

Una posible limitación que se debería considerar es la posible existencia de un sesgo de confusión por indicación de tratamiento (uso de suplementos). Al no conocerse la razón por la cual las mujeres embarazadas tomaban altas dosis de suplementos, y la

posibilidad de que algunas embarazadas tomaran altas dosis de suplementos por indicación médica (ej. haber tenido antecedentes médicos previos de abortos u otros sucesos adversos) y que fueran las razones que causan la indicación las que generaran la asociación. Incluso generándose la posibilidad de un fenómeno de causalidad inversa. En este sentido, repetimos el análisis excluyendo a las 162 mujeres que indicaron haber tenido algún antecedente de complicaciones en embarazos previos. Los resultados se mantuvieron por lo que pensamos que no es poco probable un fenómeno de causalidad inversa.



1. La dieta por si sola es insuficiente para cumplir la recomendación dietética de ingerir >600 mcg/día en un alto porcentaje de embarazadas
2. Los principales grupos de alimentos contribuidores a la ingesta dietética de F en ambos periodos del embarazo fueron las verduras (25.8%), las frutas (15.5%), las legumbres (9.5%), los lácteos (9.4%) y el pan (8.7%). A nivel individual, los alimentos que más aportaron fueron las lechugas (9.4%), las legumbres (8.7%), el pan blanco (6.5%), las naranjas (5.3%) y los cereales (4.9%)
3. La prevalencia de uso de suplementos en preconcepción, etapa crítica para prevenir los defectos del tubo neural, fue 19.2%.
4. Un 36.2% de embarazadas inician la suplementación en el mes 3, cuando ya no existe recomendación y la continúa hasta el final del embarazo.
5. El 30% de las embarazadas que tomaba suplementos de AF en peri concepción superó el límite superior tolerable de 1mg/d
6. El ser mujer joven, de menor nivel educativo y con un embarazo no planificado son factores que aumentan el riesgo de incumplir la suplementación con 400 µg/día de AF desde 2 meses antes de la concepción hasta el 2º mes de embarazo.
7. El ser no española, tener bajo nivel de estudios, ser fumadora, no haber planificado el embarazo, no haber visitado al ginecólogo privado, haber tenido hijos previos y no haber tenido antecedentes médicos previos, se asoció a no alcanzar el nivel recomendado de 600 µg/día en el primer periodo de estudio(preconcepción-mes3)
8. El uso de suplementos de AF a dosis mayores de 1mg/día en preconcepción y el mes 1, duplica el riesgo de tener recién nacido pequeño por edad gestacional para peso y casi quintuplica el riesgo de pequeño por edad gestacional para talla, independientemente de la ingesta de AF dietética y otros factores estudiados.
9. La ingesta de folatos procedente de la dieta se asocia con un descenso del riesgo de tener un recién nacido pequeño para edad gestacional para peso y la talla. La máxima protección para pequeño para edad gestacional para peso se observa con ingestas >245.4 mcg/ día.

10. El CFA es un instrumento adecuado para medir ingesta de AF en embarazadas ya que muestra una aceptable reproducibilidad cuando se comparan sus resultados entre sí, y una aceptablemente buena validez cuando se compara sus resultados con los niveles séricos de F. La validez se ve notablemente mejorada cuando se considera el uso de suplementos.



Los resultados y conclusiones de la presente tesis doctoral presentan las siguientes implicaciones en Salud Pública.

Esta tesis ofrece un cuadro más completo y actual sobre la ingesta de F y AF en embarazadas españolas durante todo el embarazo. Hemos observado que la mayoría de mujeres embarazadas se suplementan tarde y mal, y puesto que no hay duda acerca de los beneficios del consumo óptimo de este nutriente, parece razonable promover estrategias para mejorar la situación actual. En este sentido, además de la difusión de estos resultados entre matronas y ginecólogos, los actores principales de la prescripción de suplementos, creemos justificado abrir debates como la posible fortificación de alimentos (ej harinas) como medida de protección de salud cuya eficacia y ausencia de efectos negativos ha sido mostrada en otros países.

Debido a la aparición de un alto porcentaje de mujeres con dosis excesiva de suplementación, que pueden no ser inocuas, junto al hecho del mayor coste de los fármacos de altas dosis frente a los que contienen dosis recomendadas de AF, serían argumentos suficientes para evitar y combatir esta suplementación innecesaria y costosa. Sin eludir responsabilidades, es la administración sanitaria a los distintos niveles de acción la que debería liderar el proceso para resolver una situación de riesgo potencial para un amplio sector de la población.

Ante los hallazgos de que las dosis excesivas de suplementación de AF pueden tener una influencia adversa en la salud reproductiva, en concreto sobre el peso y la talla del recién nacido, se deberían conocer las posibles consecuencias por los actores principales de la prescripción de suplementos, y evitar la prescripción de estos fármacos de forma inadecuada.

Se debe potenciar campañas o estrategias poblacionales para favorecer el conocimiento de alimentos ricos en folato entre las mujeres embarazadas para conseguir un mejor resultado del embarazo. Así como prestar una mayor atención en el consejo nutricional antes y durante el embarazo.



- Alfirevic Z, Mousa HA, Martlew V, Briscoe L, Perez-Casal M, Toh CH. Postnatal screening for thrombophilia in women with severe pregnancy complications. *Obstet Gynecol.* 2001; 97:753–9
- Ainley NJ. Megaloblastic anaemia of pregnancy and the puerperium. *J Obstet Gynaecol Br Comm.* 1961; 68:245–60
- Aisen PS, Schneider LS, Sano M, Diaz-Arrastia R, van Dyck CH, Weiner MF, Bottiglieri T, Jin S, Stokes KT, Thomas RG, Thal LJ; Alzheimer Disease Cooperative Study. High-dose B vitamin supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2008; 300:1774-1783.
- Ananth CV, Peltier MR, De Marco C, Elsasser DA, Getahun R, Rozen R, Smulian JC. Associations between 2 polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and placental abruption. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 197: 385e1-7.
- Ananth CF, Peltier MR, Moore DF, Kinzler WL, Leclere D, Rozen RR. Reduced folate carrier 80A→G polymorphism, plasma folate, and risk of placental abruption. *Hum Genet.* 2008; 124:137-45.
- Anderson DM, Hollis BW, LeVine BR, et al. (1988) Dietary assessment of maternal vitamin D intake and correlation with maternal and neonatal serum vitamin D concentrations at delivery. *J Perinatol* 8, 46–48.
- Angier RB, Boothe JH, Hutchings BL, Mowat JH, Semb J, Stokstad EL, Subbarow Y, Waller CW, Cosulich DB, Fahrenbach MJ, Hultquist ME, Kuh E, Northey EH, Seeger DR, Sickels JP, Smith JM Jr.. Synthesis of a compound identical with the L. Casei factor isolated from liver. *Science.* 1945; 102: 227-228.
- Arija, V., Cucó, G., Vila, J., Iranzo, R. and Fernández-Ballart, J. [Food consumption, dietary habits and nutritional status of the population of Reus: follow-up from preconception throughout pregnancy and after birth]. *Med Clin (Barc).* 2004; 123: 5-11.
- Arkkola T, Uusitalo U, Pietikäinen M, Metsälä J, Kronberg-Kippilä C, Erkkola M, Veijola R, Knip M, Virtanen SM, Ovaskainen ML. Dietary intake and use of dietary supplements in relation to demographic variables among pregnant Finnish women. *Br J Nutr.* 2006; 96: 913-920.

- Baer HJ, Blum RE, Rockett HR, et al. Use of a food frequency questionnaire in American Indian and Caucasian pregnant women: a validation study. *BMC Public Health* 2005; 5, 135 – 145.
- Bailey, L. Folate status assessment. *J Nutr.* 1990; 120 Suppl 11: 1508-1511.
- Bailey, S. W. and Ayling, J. E. The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 15424-15429.
- Bazzano, L. A., Reynolds, K., Holder, K. N., He, J. Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA.* 2006; 296: 2720-2726.
- Berry RJ, Li Z, Erickson JD, et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. *N Engl J Med* 1999; 341:1485–90
- Bingham, S. Biomarkers in nutritional epidemiology. *Public Health Nutr.* 2002; 5: 821-827.
- Bjørke-Monsen AL, Ueland PM, Schneede J, Vollset SE, Refsum H. Elevated plasma total homocysteine and C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with spina bifida. *QJM.* 1997; 90: 593-6.
- Boddie AM, Dedlow ER, Nackashi JA, Opalko FJ, Kauwell GP, Gregory JF 3rd, Bailey LB. Folate absorption in women with a history of neural tube defect-affected pregnancy. *AM Clin Nutr,* 2000; 154-8
- Boushey, C. J., Beresford, S. A., Omenn, G. S. and Motulsky, A. G. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA.*1995; 274: 1049-1057.
- Bower C, Stanley FJ, Croft M, de Klerk NH, Davis RE, Nicol DJ. Absorption of pteroylpolyglutamates in Mothers of infants with neural tube defects. *Br J Nutr,* 1993; 827-34
- Brantsaeter AL, Haugen M, Hagve TA, et al. Selfreported dietary supplement use is confirmed by biological markers in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Ann Nutr Metab.* 2007; 51, 146–154.
- Brown JE, Buzzard IM, Jacobs DR Jr, et al. A food frequency questionnaire can detect pregnancy-related changes in diet. *J Am Diet Assoc.* 1996; 96, 262–266.
- Busby, A., Abramsky, L., Dolk, H., Armstrong, B. and Group, E. F. A. W. Preventing neural tube defects in Europe: population based study. *BMJ.* 2005; 330: 574-575.

- Cade, J., Thompson, R., Burley, V. and Warm, D. Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires - a review. *Public Health Nutr.* 2002; 5: 567-587.
- Cárcel C, Quiles J, Rico B, Sanchis T. Adecuación de la ingesta nutricional de embarazadas de segundo y tercer trimestre. *Rev Esp Nutr Comunitaria* 2005;11(3):136-44.
- Carrascosa A, Yeste D, Copil A, Gussinyé M. Secular growth changes. Weight, height and body mass index values in infant, children, adolescent and young adults from Barcelona population. *Med Clin(Bcn).* 2004; 123: 445–451.
- Catov JM, Bodnar LM, Ness RB, Markovic N, Roberts JM. Association of periconceptional multivitamin use and risk of preterm or small-for-gestational-age births. *Am J Epidemiol.* 2007;166:296-303. Epub 2007 May 11.
- Chanarin I, Rothman D, Ward A, Perry J. Folate status and requirement in pregnancy. *Br Med J.* 1968; 2: 390–4
- Charles, D. H., Ness, A. R., Campbell, D., Smith, G. D., Whitley, E. and Hall, M. H. Folic acid supplements in pregnancy and birth outcome: re-analysis of a large randomised controlled trial and update of Cochrane review. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2005; 19: 112-124.
- Chen, T. F., Huang, R. F., Lin, S. E., Lu, J. F., Tang, M. C. and Chiu, M. J. Folic Acid potentiates the effect of memantine on spatial learning and neuronal protection in an Alzheimer's disease transgenic model. *J Alzheimers Dis.* 2010; 20: 607-615.
- Choi, S. W. and Mason, J. B. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr.* 2000; 130: 129-132.
- Clarke, R., Lewington, S., Sherliker, P. and Armitage, J. Effects of B-vitamins on plasma homocysteine concentrations and on risk of cardiovascular disease and dementia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007; 10: 32-39.
- Cole, B. F., Baron, J. A., Sandler, R. S. et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2007; 297: 2351-2359.
- Collaboration, H. L. T. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of the randomized trials. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82: 806-812.
- Combs, G. *The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health.* Elsevier Academic Press, Burlington. 2008
- Cotter AM, Molloy AM, Scott JM, Daly SF. Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: a risk factor of development severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 185: 781-5.

- Cotter AM, Molloy AM, Scott JM, Daly SF. Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: a risk factor of development severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189: 391-6
- Craciunescu CN, Brown EC, Mar M-H, Albright CD, Nadeau MR, Zeisel SH. Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J Nutr.* 2004; 134:162–6
- Cravo ML, Pinto AG, Chaves P, Cruz JA, Lage P, Nobre Leitão C, Costa Mira F. Effect of folate supplementation on DNA methylation of rectal mucosa in patients with colonic adenomas: correlation with nutrient intake. *Clin Nutr.* 1998;17:45-9.
- Czeizel, A. and Dudás, I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med.* 1992; 327: 1832-1835.
- Czeizel, E. and Dudás, I. [Prevention of the first occurrence of anencephaly and spina bifida with periconceptional multivitamin supplementation (conclusion)]. *Orv Hetil.* 1994a; 135: 2313-2317.
- Czeizel AE, Dudás I, Météneki J. Pregnancy outcomes in a randomised controlled trial of periconceptional multivitamin supplementation. Final report. *Arch Gynecol Obstet* 1994b; 255: 131–9
- Cárcel, C., Quiles, J., Rico, B. and Sanchis, T. Adecuación de la ingesta nutricional de embarazadas de segundo y tercer trimestre. *Rev Esp Nutr Comunitaria.* 2005; 11: 136-144.
- Daly, S., Cotter, A., Molloy, A. E. and Scott, J. Homocysteine and folic acid: implications for pregnancy. *Semin Vasc Med.* 2005; 5: 190-200.
- Daltveit AK, Vollset SE, Lande B, Øien H.
Changes in knowledge and attitudes of folate, and use of dietary supplements among women of reproductive age in Norway 1998-2000. *Scand J Public Health.* 2004;32(4):264-71.
- Daniel WA Jr, Mounger JR, Perkins JC. Obstetric and fetal complications in folate-deficient adolescent girls. *Am J Obstet Gynecol.* 1971; 111: 233-8.
- D'Aniello G, Florio P, Sabatini L, et al. The search for thrombophilic gene mutations in women with gestational hypertension does not help in predicting pregnancy outcome. *J Hypertens.* 2003; 21: 1915-20.
- de Weerd S, Steegers-Theunissen RPM, de Boo TM, Thomas CMG, Steegers EAP. Maternal periconceptional biochemical and hematological parameters, vitamin profiles and pregnancy outcome. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:1128–34

- Ebbing, M., Bønaa, K., Nygård, O. et al. Cancer incidence and mortality after treatment with folic acid and vitamin B12. *JAMA*. 2009; 302: 2119-2126.
- Eichholzer, M., Tönz, O. and Zimmermann, R. Folic acid: a public-health challenge. *Lancet*. 2006; 367: 1352-1361.
- Erkkola M, Karppinen M, Javanainen J, et al. (2001) Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire for pregnant Finnish women. *Am J Epidemiol* 154, 466–476.
- Fawzi WW, Rifas-Shiman SL, Rich-Edwards JW, Willett WC, Gillman MW. Calibration of a semi-quantitative food frequency questionnaire in early pregnancy. *Ann Epidemiol*. 2004;14:754-62.
- Ferguson SE, Smith GN, Saleniek ME, Windrim R, Walker MC. Preterm premature rupture of membranes: nutritional and socioeconomic factors. *Obstet Gynecol* 2002; 100:1250–6
- Ferguson SA, Berry KJ, Hansen DK, Wall KS, White G, Antony AC. Behavioral effects of prenatal folate deficiency in mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005; 73:249–52
- Fernández Ballart, J. D., Arija Val, V., Gucó Pastor, G. and M, M. Nutrición durante el embarazo y la lactancia. In: *Nutrición y Salud Pública. Métodos, bases científicas y aplicaciones*, (A. B. Serra Majem L, J ed.), pp. 275-287. Masson-Elsevier, Barcelona. 2006
- Figueiredo, J. C., Grau, M. V., Haile, R. W., Sandler, R. S., Summers, R. W., Bresalier, R. S., Burke, C. A., McKeown-Eyssen, G. E. and Baron, J. A. Folic acid and risk of prostate cancer: results from a randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 101: 432-435.
- Fleming, A. The role of folate in the prevention of neural tube defects: human and animal studies. *Nutr Rev*. 2001; 59: S13-21
- Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 2000;15:458–62
- Forsythe HE & Gage B Use of a multicultural foodfrequency questionnaire with pregnant and lactating women. *Am J Clin Nutr*. 1994 59, S203–S206.
- García Carballo, M., González González, A. and Jiménez García, R. [Prophylaxis of neural tube defects with folic acid in pregnant women from a health district]. *Aten Primaria*. 2003; 31: 98-103.

- García López, E., Rodríguez Dehli, C., Ariza Hevia, F., Rodríguez Fernández, A., Fernández Toral, J., Riaño Galán, I. and Mosquera Tenreiro, C. [Prevalence of neural tube defects in Asturias (Spain): impact of prenatal diagnosis]. *Gac Sanit.* 2009; 23: 506-511.
- Gerhard, G. T. and Duell, P. B. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1999; 10: 417-428.
- Gilbert, M., Juncosa, N. and Martin, I. Prevención Primaria de los defectos del tubo neural en la población atendida en un hospital de referencia. *Prog Obstet Ginecol.* 2003; 43: 13-22.
- Giles C. An account of 335 cases of megaloblastic anaemia of pregnancy and the puerperium. *J Clin Pathol* 1966; 19:1–11
- Gindler J, Li Z, Berry RJ, et al. Folic acid supplements during pregnancy and risk of miscarriage. *Lancet* 2001; 358:796–800
- Goddijn-Wessel TA, Wouters MG, van de Molen EF, Spuijbrock MD, Steegers-Theunissen RP, Blom HJ, Boers GH, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1996; 66: 23-9.
- Godfrey, K. and Barker, D. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr.* 2001; 4: 611-624.
- Goh YI, Koren G. Folic acid in pregnancy and fetal outcomes. *J Obstet Gynaecol.* 2008; 28:3-13.
- Gospe SM Jr, Gietzen DW, Summers PJ, et al. Behavioral and neurochemical changes in folate-deficient mice. *Physiol Behav* 1995;58:935–41
- Greeley S, Storbakken L & Magel R Use of a modified food frequency questionnaire during pregnancy. *J Am Coll Nutr.* 1992; 11, 728–734.
- Gross RL, Newberne PM, Reid JVO. Adverse effects on infant development associated with maternal folic acid deficiency. *Nutr Rep Int* 1974;10:241–8
- Gutierrez, J., Perez, F., Tamarillas, M. and Calvo, M. (2003) Prevención de los defectos del tubo neural mediante la suplementación adecuada con ácido fólico. *AtenFarm*, 5, 84-92.
- Habibzadeh N, Schorah CJ, Sellar MJ, Smithells RW, Levene MI. Uptake and utilization of DL-5-[methyl-14C] tetrahydropteroylmonoglutamate by cultured cytotrophoblasts associated with neural tube defects. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1993, 203,45-54.

- Hall MH. Folic acid deficiency and abruption placentae. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 1972; 79: 222-5.
- Halsted, C. Intestinal absorption of dietary folates. In: *Folic acid metabolism in health and disease*, (M. Picciano, E. Stokstand and J. Gregory eds.). Wiley-Liss, New York. 1990
- Hassapidou M, Papadopoulou N. Assessment of the dietary intakes of healthy adult pregnant women in Cyprus. *Nutrition & Food Science* 2000;30:111-15.
- Hefler L, Jirecek S, Heim K, et al. Genetic polymorphisms associated with thrombophilia and vascular disease in women with unexplained late intrauterine fetal death: a multicenter study. *J Soc Gynecol Invest* 2004; 11:42-4
- Henríquez-Sánchez, P., Sánchez-Villegas, A., Doreste-Alonso, J., Ortiz-Andrellucchi, A., Pfrimer, K. and Serra-Majem, L. Dietary assessment methods for micronutrient intake: a systematic review on vitamins. *Br J Nutr.* 2009 102 Suppl 1: S10-37.
- Henry GR. The aetiology of abruption placentae with special reference to folate metabolism. *Irish J Med Sci.* 1968; 7: 509-15.
- Hibbard BM, Hibbard ED. Aetiological factors in abruption placentae. *Br Med J.* 1963; 2: 1430-6.
- Hibbard, B. M. The role of folic acid in pregnancy; with particular reference to anemia, abruption and abortion. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*, 1964; 71: 529-542.
- Hibbard BM, Hibbard ED, Hwa TS, Tan P. Abruptio placentae and defective folate metabolism in Singapore women. *J Obstet Gynecol Br Commow.* 1969; 73: 1003-7.
- Hibbard, B. M. Folates and the fetus. *S Afr Med J*, 1975; 49: 1223-1226.
- Hibbard, B. M. and Hibbard, E. D. Folate metabolism and reproduction. *J Physiol*, 1971; 219: 16P.
- Hogg BB, Tamura T, Johnston KE, Dubard MB, Goldenberg RL. Second-trimestre plasma homocysteine levels and pregnancy-induced hypertension, preeclampsia, and intrauterine growth restriction. *Am J. Obstet Gynecol.* 2000; 183: 805-9.
- Institute of Medicine. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, DC: National Academy Press. 1998
- Irles Rocamora, J. A., Iglesias Bravo, E. M., Avilés Mejía, S., Bernal López, E., Benito del Valle Galindo, P., Moriones López, L., Maetzu Aznar, A. and Mingo Canal, D.

- Valor nutricional de la dieta en embarazadas sanas. Resultado de una encuesta dietética en gestantes. *Nutrición Hospitalaria*. 2003; 18: 248-252.
- Isotalo P, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet*. 2000; 67:986–90
- Jaaskelainen E, Keski-Nisula L, Tovivonen S, Romppanen EL, Helisalme S, Punnonen K, Heinonen S. MTHFR C677T polymorphism is not associated with placental abruption or preeclampsia in Finnish women. *Hypertens Pregnancy*. 2006; 25: 73-80.
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, et al Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93:7–9
- Julvez J, Fortuny J, Mendez M, Torrent M, Ribas-Fitó N, Sunyer J. Maternal use of folic acid supplements during pregnancy and four-year-old neurodevelopment in a population-based birth cohort. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2009;23:199-206
- Kaiser T, Brennecke SP, Moses EK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms are not a risk factor for pre-eclampsia/eclampsia in Australian women. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50:100–2
- Katan, M. B., Boekschoten, M. V., Connor, W. E., Mensink, R. P., Seidell, J., Vessby, B. and Willett, W. Which are the greatest recent discoveries and the greatest future challenges in nutrition? *Eur J Clin Nutr*. 2009; 63: 2-10.
- Kim, Y. I Does a high folate intake increase the risk of breast cancer? *Nutr Rev*. 2006; 64: 468-475.
- Knudtson EJ, Smith K, Mercer BM, et al. Serum homocysteine levels after preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:537–41
- Konings EJ, Roomans HH, Dorant E, Goldbohm RA, Saris WH, van den Brandt PA. Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. *Am J Clin Nutr*. 2001 Apr;73(4):765-76.
- Kronenberg G, Colla M, Endres M. Folic acid, neurodegenerative and neuropsychiatric disease. *Curr Mol Med*. 2009 Apr;9(3):315-23.
- Kupfermanc MJ, Eldor A, Steinman N, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340:9–13

- Kutteh WH, Park VM, Deitcher SR. Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first-trimester recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 1999;71:1048–53
- Laivuori H, Kaaja R, Turpeinen U, Viinikka I, Ylikorkala O. Plasma homocysteine levels elevated and inversely related to insulin sensitivity in preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 1999; 93: 489-93.
- Lindblad B, Zaman S, Malik A, Martin H, Ekström AM, Amu S, Holmgren A, Norman M. Folate, vitamin B12, and homocysteine levels in South Asian women with growth-retarded fetuses. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005;84:1055-61.
- López-Quesada E, Vilaseca MA, Laila JM. Plasma total homocysteine in uncomplicated pregnancy and in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003; 108: 45-9.
- Lucock, M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab.* 2000; 71: 121-138.
- Lucock, M. Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *BMJ.* 2004; 328: 211-214.
- Lucock M, Yates Z. Folic acid - vitamin and panacea or genetic time bomb? *Nat Rev Genet.* 2005 Mar;6(3):235-40.
- Maats FH, Crowther CA. Patterns of vitamin, mineral and herbal supplement use prior to and during pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2002 Nov;42(5):494-6.
- Main, P. A., Angley, M. T., Thomas, P., O'Doherty, C. E. and Fenech, M. Folate and methionine metabolism in autism: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2010; 91: 1598-1620.
- Margetts BM, N. M. *Design Concepts in Nutritional Epidemiology.* Oxford University Press, Oxford. 1997
- Mariscal-Arcas M, Rivas A, Monteagudo C, Granada A, Cerrillo I, Olea-Serrano F. Proposal of a Mediterranean diet index for pregnant women. *Br J Nutr* 2009;102:744-9.
- Martin JD, Davis RE. Serum folic acid activity and vaginal bleeding in early pregnancy. *J Obstet Gyn Br Comm* 1964; 71:400–3
- Martin RH, Harper TA, Kelso W. Serum-folic-acid in recurrent abortions. *Lancet* 1965; i: 670–2
- Martinelli I, Taioli E, Cetin I, et al. Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. *N Engl J Med* 2000; 343:1015–8

- Martínez-Frías, M. and ECEM. Adecuación de las dosis de ácido fólico en la prevención de defectos congénitos. *Med Clin(Barc)*. 2007; 128: 609-616.
- Martínez-Frías, M. L., Rodríguez-Pinilla, E. and Bermejo, E. Análisis de la situación en España sobre el consumo de ácido fólico/folinato cálcico para la prevención de defectos congénitos. *Med Clin(Barc)*. 2003; 121: 772-775.
- Mathews F., Yudkin P., Neil A. Influence of maternal nutrition on outcome of pregnancy: prospective cohort study. *BMJ*. 2003; 319: 339-343.
- Menon MKK, Sengupta M, Ramaswamy N. Accidental hemorrhaged and folic acid deficiency. *J Obstet Gynaecol Br Comm*. 1966; 73: 49-52.
- Mikkelsen, T., Osler, M. and Olsen, S. Validity of protein, retinol, folic acid and n-3 fatty acid intakes estimated from the food-frequency questionnaire used in the Danish National Birth Cohort. *Public Health Nutr*. 2006; 9: 771-778.
- Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet*. 1995; 345:149-51.
- Mitchell, E. A., Robinson, E., Clark, P. M., Becroft, D. M., Glavish, N., Pattison, N. S., Pryor, J. E., Thompson, J. M. and Wild, C. J. Maternal nutritional risk factors for small for gestational age babies in a developed country: a case-control study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*.2004; 89: F431-435.
- Mitchell, H. K., Snell, E. E. and Williams, R. J. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 63, 1941: The concentration of "folic acid" by Herschel K. Mitchell, Esmond E. Snell, and Roger J. Williams. *Nutr Rev*. 1998; 46: 324-325.
- Mouratidou, T., Ford, F., Prountzou, F. and Fraser, R. Dietary assessment of a population of pregnant women in Sheffield, UK. *Br J Nutr*. 2006; 96: 929-935.
- Murakami S, Matsubara N, Saitoh M, Miyakawa S, Shoji M, Kubo T. The relation between plasma homocysteine concentration and methyl-ene-tetrahydrofolate reductase gene polymorphism in pregnant women. *J Obstet Gynaecol Res*. 2001; 27: 349-52.
- MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet*. 1991; 338: 131-137.
- Neiger R, Wise C, Contag SA, Tumber MB, Canick JA. First trimester bleeding and pregnancy outcome in gravidas with normal and low folate levels. *Am J Perinatol* 1993;10:460–2

- Neggens, Y. H., Goldenberg, R. L., Tamura, T., Cliver, S. P. and Hoffman, H. J. The relationship between maternal dietary intake and infant birthweight. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl.* 1997; 165: 71-75.
- Nelen WLDM, Blom HJ, Steegers EAP, den Heijer M, Thomas CMG, Eskes TKAB. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2000a; 95:519–24
- Nelen WLDM, Blom HJ, Steegers EAP, den Heijer M, Eskes TKAB. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2000b; 74:1196–9
- Nelen WLDM, Blom HJ, Thomas CMG, Steegers EAP, Boers GHJ, Eskes TKAB. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *J Nutr* 1998; 128:1336–41
- Nelson C, Wengreen HJ, Munger RG, Corcoran CD. Dietary folate, vitamin B-12, vitamin B-6 and incident Alzheimer's disease: the cache county memory, health and aging study. *J Nutr Health Aging.* 2009;13:899-905.
- Nurk E, Tell GS, Refsum H, Ueland P, Vollset SE. Associations between maternal methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and adverse outcomes of pregnancy: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Med.* 2004; 117: 26-31-
- O'Neill, M. E., Carroll, Y., Corridan, B. et al. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *Br J Nutr.* 2001; 85: 499-507.
- Olsen SF, Hansen HS, Sandström B, et al. Erythrocyte levels compared with reported dietary intake of marine n-3 fatty acids in pregnant women. *Br J Nutr* 1995; 73, 387–395.
- Ortiz-Andrellucchi, A., Doreste-Alonso, J., Henríquez-Sánchez, P., Cetin, I. and Serra-Majem, L. Dietary assessment methods for micronutrient intake in pregnant women: a systematic review. *Br J Nutr.* 2009a; 102: S64-86.
- Ortiz-Andrellucchi, A., Henríquez-Sánchez, P., Sánchez-Villegas, A., Peña-Quintana, L., Mendez, M. and Serra-Majem, L. Dietary assessment methods for micronutrient intake in infants, children and adolescents: a systematic review. *Br J Nutr.* 2009b; 102: S87-117.

- Owen EP, Human L, Carolissen AA, Harley EH, Odendaal HJ. Hyperhomocysteinemia- a risk factor for abruption placentae. *J Inherit Metab Dis.* 1997; 20: 359-62.
- Palma I, F. A., Cantós. Tablas de composición de Alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España. CESNID. MADRID. Mc Graw Hill Interamerican.2008
- Parle-McDermott A, Mills JL, Kirke PN, Cox C, Signore CC, Kirke S, Molloy AM, O'Leavy VB, Pangilian FJ, O'Herlihy C, Brody LC, Scott JM. MTHFD1 R653Q polymorphism is a maternal genetic risk factor for severe abruption placentae. *Am J Med Genet A.* 2005; 132: 365-8.
- Parra MS, Schnaas L, Meydani M, et al. Erythrocyte cell membrane phospholipid levels compared against reported dietary intakes of polyunsaturated fatty acids in pregnant Mexican women. *Public Health Nutr* 2002; 5, 931–937.
- Patrick TE, Powers RW, Daftary AR, Ness RB, Roberts JM. Homocysteine and folic acid are inversely related in black women with preeclampsia. *Hypertension.* 2004; 43; 1279-82
- Pérez-Mutul J, González-Herrera L, Sosa-Cabrera T, Martínez-Olivares R. A mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with preeclampsia in women of southeast Mexico. *Arch Med Res* 2004; 35:231–4
- Pegoraro RJ, Chikosi A, Rom L, Roberts C, Moodley J. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in black South Africans and the association with preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83:449–54
- Perry, I. J., Refsum, H., Morris, R. W., Ebrahim, S. B., Ueland, P. M. and Shaper, A. G. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet.* 1995; 346: 1395-1398.
- Petri, M., Roubenoff, R., Dallal, G. E., Nadeau, M. R., Selhub, J. and Rosenberg, I. H. Plasma homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 1996; 348: 1120-1124.
- Pinto, E., Barros, H. and dos Santos Silva, I. Dietary intake and nutritional adequacy prior to conception and during pregnancy: a follow-up study in the north of Portugal. *Public Health Nutr.* 2009; 12: 922-931.
- Powers RW, Dunbard MS, Gallaher MJ, Robers MJ. The 667 C-T methylenetetrahydrofolate reductase mutation does not predict increased maternal homocysteine during pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2003; 101: 762-6.

- Powers RW, Minich LA, Lykins DL, Ness RB, Crombleholme WR, Roberts JM. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, folate, and susceptibility to preeclampsia. *J Soc Gynecol Invest* 1999; 6:74–9
- Powers RW, Evans RW, Majors AK et al. Plasma homocysteine concentration is increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation. *Am J Obstet Gynecol.* 1998; 179:1605-11.
- Prasmusinto D, Skrablin S, Hofstaetter C, Fimmers R, van der Ven K. The methylenetetrahydrofolate reductase 677 C→T polymorphism and preeclampsia in two populations. *Obstet Gynecol* 2002; 99:1085–92
- Pritchard JA, Cunningham FG, Pritchard SA, Mason RA. On reducing the frequency of severe abruption placentae. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 165: 1345-51.
- Quere I, Bellet H, Hoffet M, Janbon C, Mares P, Gris J-C. A woman with five consecutive fetal deaths: case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinemia prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 1998;69:152–4
- Ramón, R., Ballester, F., Iñiguez, C., Rebagliato, M., Murcia, M., Esplugues, A., Marco, A., García de la Hera, M. and Vioque, J. Vegetable but not fruit intake during pregnancy is associated with newborn anthropometric measures. *J Nutr.* 2009; 139: 561-567.
- Rajkovic A, Catalano PM, Malinow MR. Elevated homocysteine levels with preeclampsia. *Obstet Gynaecol.* 1997, 90: 168-71.
- Ray JG, Mamdani MM. Association between folic acid food fortification and hypertension or preeclampsia in pregnancy. *Arch Intern Med* 2002; 162:1776–7
- Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic reviews. *Placenta.* 1999; 20: 519-29.
- Refsum, H., Ueland, P. M., Nygård, O. and Vollset, S. E. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med.* 1998; 49: 31-62.
- Relton CL, Pearce MS, Burn J, Parker L. An investigation of folate-related genetic factors in the determination of birthweight. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2005;19:360-7.
- Robinson S, Godfrey K, Osmond C, et al. Evaluation of a food frequency questionnaire used to assess nutrient intakes in pregnant women. *Eur J Clin Nutr.* 1996; 50, 302–308.

- Rohan TE, Jain M, Howe GR, Miller AB. Alcohol consumption and risk of breast cancer: a cohort study. *Cancer Causes Control*. 2000;11:239-47.
- Rondó PH, Villar BS & Tomkins AM. Vitamin A status of pregnant women assessed by a biochemical indicator and a simplified food frequency questionnaire. *Arch Latinoam Nutr* 1999; 49, 322–325.
- Ronneberg AG, Goldman MB, Chen D, Aitken IW, Willett WC, Selhub J, Xu X. Preconception homocysteine and B vitamin status and birth outcomes in Chinese women. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76: 1385-91.
- Rolschau, J., Kristoffersen, K., Ulrich, M., Grinsted, P., Schaumburg, E. and Foged, N. The influence of folic acid supplement on the outcome of pregnancies in the county of Funen in Denmark. Part I. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999; 87: 103-110
- Rosenblatt DS, Fenton WA. Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, et al, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill, 2001:3897–933
- Roza, S., van Batenburg-Eddes, T., Steegers, E., Jaddoe, V., Mackenbach, J., Hofman, A., Verhulst, F. and Tiemeier, H. Maternal folic acid supplement use in early pregnancy and child behavioural problems: The Generation R Study. *Br J Nutr*. 2009 1-8.
- Sanchez SE, Zhang C, Malinow MR, Ware-Juaregui S, Larrabure G, Williams MA. Plasma folate, vitamin B12 and homocysteine concentrations in preeclamptic and normotensive Peruvian women. *Am J Epidemiology*. 2001; 153: 474-80.
- Sanjoaquin, M. A., Allen, N., Couto, E., Roddam, A. W. and Key, T. J. Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Int J Cancer*. 2005; 113: 825-828.
- Scholl, T. and Johnson, W. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71: 1295S-1303S.
- Scholl TO, Hediger ML, Bendich A, Schall JI, Smith WK, Krueger PM. Use of multivitamin/mineral prenatal supplements: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Epidemiol*. 1997;146:134-41.
- Scholl TO, Hediger ML, Schall JI, Khoo CS, Fischer RL. Dietary and serum folate: their influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 1996 Apr;63(4):520-5.

- Sellers TA, Kushi LH, Cerhan JR, Vierkant RA, Gapstur SM, Vachon CM, Olson JE, Therneau TM, Folsom AR. Dietary folate intake, alcohol, and risk of breast cancer in a prospective study of postmenopausal women. *Epidemiology*. 2001;12:420-8.
- Sellers TA, Alberts SR, Vierkant RA, Grabrick DM, Cerhan JR, Vachon CM, Olson JE, Kushi LH, Potter JD. High-folate diets and breast cancer survival in a prospective cohort study. *Nutr Cancer*. 2002;44:139-44.
- Shaw, G. M., Liberman, R. F., Todoroff, K. and Wasserman, C. R. Low birth weight, preterm delivery, and periconceptional vitamin use. *J Pediatr*. 1997; 130: 1013-1014.
- Siega-Riz AM, Savitz DA, Zeisel SH, Thorp JM, Herring A. Second trimester folate status and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191:1851-7.
- Smach MA, Jacob N, Golmard JL, Charfeddine B, Lammouchi T, Ben Othman L, Dridi H, Bennamou S, Limem K. Folate and homocysteine in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease or dementia: a case control study. *Eur Neurol*. 2011;65:270-8
- Smulders, Y. M. and Stehouwer, C. D. Folate metabolism and cardiovascular disease. *Semin Vasc Med*, 2005; 5: 87-97.
- Stegers-Theunissen RPM, Boers GJK, Trijbels FJM, Eskes TKAB. Neural-tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N Engl J Med*, 1991, 324, 199-200.
- Stegers-Theunissen RP, Boers GH, Bloom HJ, Trijbels FJ, Eskes TK. Hyperhomocysteinaemia and recurrente spontaneous abortion or abruption placentae. *Lancet*. 1992; 339: 1122-3.
- Stegers-Theunissen RP, Van Iersel CA, Peer PG, Nelen WL, Steegers EA. Hyperhomocysteinemia, pregnancy complications, and the timing of investigation. *Obstet Gynecol*. 2004; 104: 336-43.
- Stegers-Theunissen, R. P., Obermann-Borst, S. A., Kremer, D., Lindemans, J., Siebel, C., Steegers, E. A., Slagboom, P. E. and Heijmans, B. T. Periconceptional maternal folic acid use of 400 micrograms per day is related to increased methylation of the IGF2 gene in the very young child. *PLoS One*, 2009;4: e7845.
- Steriff RR, Little AB. Folic acid deficiency in pregnancy. *N Engl J Med*. 1967; 276: 776-9.
- Subar, A. F. Developing dietary assessment tools. *J Am Diet Assoc*. 2004; 104: 769-770.
- Sweeney, M. R., Staines, A., Daly, L., Traynor, A., Daly, S., Bailey, S. W., Alverson, P. B., Ayling, J. E. and Scott, J. M. 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.
- Tamura T, Goldenberg RL, Chapman VR, Johnston KE, Ramey SL, Nelson KG. Folate status of mothers during pregnancy and mental and psychomotor development of their children at five years of age. *Pediatrics* 2005;116:703–8
- Tamura, T. and Picciano, M. Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr*, 2006.83, 993-1016.
- Takimoto H, Mito N, Umegaki K, Ishiwaki A, Kusama K, Abe S, Yamawaki M, Fukuoka H, Ohta C, Yoshiike N. Relationship between dietary folate intakes, maternal plasma total homocysteine and B-vitamins during pregnancy and fetal growth in Japan. *Eur J Nutr*. 2007; 46: 300-6.
- Taparia S, Gelineau-van Waes J, Rosenquist TH, Finnell RH. Importance of folate-homocysteine homeostasis during early embryonic development. *Clin Chem Lab Med*. 2007, 45:1717-27.
- Timmermans, S., Jaddoe, V. W., Hofman, A., Steegers-Theunissen, R. P. and Steegers, E. A. Periconception folic acid supplementation, fetal growth and the risks of low birth weight and preterm birth: the Generation R Study. *Br J Nutr*. 2009; 102: 777-785.
- Unfried G, Griesmacher A, Weismüller W, Nagele F, Huber JC, Tempfer CB. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and idiopathic recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol* 2002;99:614–9
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2010. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>
- Vadachkoria S, Sanchez SE, Qui C, Muiy-Rivera M, Malinow MR, Williams MA. Hyperhomocysteinemia and elevated soluble vascular cell adhesion molecule-1 concentrations are associated with an increased risk of preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest*. 2004; 58: 133-9.
- Vanderjagt DJ, Patel RJ, EI-Nafaty AU, Melah GS, Crossey MJ, Glew RH. High-density lipoprotein and homocysteine levels correlate inversely in preeclamptic women in northern Nigeria. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2004; 83: 536-42.
- van der Molen EF, Arends GE, Nelen WL, van der Put NJ, Heil SG, Eskes Tk, Blom HJ. A common mutation in the 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase gene as a new risk factor for placental vasculopathy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 182: 1258-63.

- van Eijsden, M., Smits, L. J., van der Wal, M. F. and Bonsel, G. J. Association between short interpregnancy intervals and term birth weight: the role of folate depletion. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88: 147-153.
- Varadi S, Abbott D, Elwis A. Correlation of peripheral white cell and bone marrow changes with folate levels in pregnancy and their clinical significance. *J Clin Pathol* 1966;19:33–6
- Vefring H, Lie RT, Ødegård R, Mansoor MA, Nilsen ST. Maternal and fetal variants of genetic thrombophilias and the risk of preeclampsia. *Epidemiology* 2004; 15:317–22
- Vioque, J. Validez de la evaluación de la ingesta dietética. In: *Nutrición y Salud Pública. Métodos, bases científicas y aplicaciones*, (A. B. Serra Majem L, J ed.), pp. 199-210. Masson-Elsevier, Barcelona.2006
- Vioque, J. and Gonzalez, L. Validity of a food frequency questionnaire (preliminary results). *Eur J Cancer Prev.* 1991; 1: 19-20.
- Vioque, J., Quiles, J., García de la Hera, M., Guillén, M., Ponce, E. and Muñoz, P. [Folic acid ingestion and associated factors in adult women 15-44 years of age in the Valencian Community]. *Med Clin (Barc).* 2000; 114: 414-416.
- Vioque, J., Weinbrenner, T., Asensio, L., Castelló, A., Young, I. and Fletcher, A. Plasma concentrations of carotenoids and vitamin C are better correlated with dietary intake in normal weight than overweight and obese elderly subjects. *Br J Nutr.* 2007; 97: 977-986.
- Voutilainen, S., Rissanen, T. H., Virtanen, J., Lakka, T. A., Salonen, J. T. and Study, K. I. H. D. R. F. Low dietary folate intake is associated with an excess incidence of acute coronary events: The Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study. *Circulation.* 2001; 103: 2674-2680.
- Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, Monsen AL, Ueland PM. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 962-8.
- Watanabe H, Fukuoka H, Sugiyama T, Nagai Y, Ogasawa K, Yoshiike N. Dietary folate intake during pregnancy and birth weight in Japan. *Eur J Nutrition.* 2008; 183:805-

- Wei EK, Gardner J, Field AE, et al. Validity of a food frequency questionnaire in assessing nutrient intakes of low-income pregnant women. *Matern Child Health J.* 1999; 3, 241–246.
- Whalley PJ, Scott DE, Pritchard JA. Maternal folate deficiency and pregnancy wastage. I. Placental abruption. *Am J Obstet Gynecol.* 1969; 105: 670-8.
- Whitley JR, O'Dell BL, Hogan AG. Effect of diet in maze learning in second-generation rats. Folic acid deficiency. *J Nutr* 1951;45:153–60
- Whitrow, M., Moore, V., Rumbold, A. and Davies, M. Effect of supplemental folic acid in pregnancy on childhood asthma: a prospective birth cohort study. *Am J Epidemiol.* 2009; 170:1486-1493.
- Willett, W. *Nutritional Epidemiology* (2nd ed.): Oxford Univ Press. New York. 1998
- Willett, W., Sampson, L., Stampfer, M., Rosner, B., Bain, C., Witschi, J., Hennekens, C. and Speizer, F. Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Am J Epidemiol.* 1985; 122: 51-65.
- Williams MA, Sanchez SE, Zhang C, Bazul V. Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C→T polymorphism and plasma folate in relation to pre-eclampsia risk among Peruvian women. *J Matern-Fetal Neonatal Med* 2004; 15:337–44
- Wills, L. Treatment of “pernicious anemia of pregnancy” and “tropical anemia”. *Br Med J.* 1931; 1: 1059-1064.
- Winkels, R. M., Brouwer, I. A., Siebelink, E., Katan, M. B. and Verhoef, P. Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85: 465-473.
- Wouters MGAJ, Thomas CMG, Boers GHJ, et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril* 1993; 60:820–5
- Xu, X. and Chen, J. One-carbon metabolism and breast cancer: an epidemiological perspective. *J Genet Genomics.* 2009; 36: 203-214.
- Zeisel, S. H. Importance of methyl donors during reproduction. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89: 673S-677S.
- Zetterberg H, Zafiropoulos A, Spandidos DA, Rymo L, Blennow K. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2003;18:1948–50

Reproducibility and biochemical calibration of a Food Frequency Questionnaire in pregnant women

Jesús Vioque,^{1,2} Eva-María Navarrete-Muñoz,^{1,2} Daniel Gimenez,^{1,2} Manuela García de la Hera,^{1,2} Marisa Rebagliato,² Ferran Ballester,^{2, 3} Mario Murcia,^{2, 3} Carmen Iñiguez,^{2, 3} Rosa Ramón^{2,4} on behalf of the INMA-Valencia Cohort Study

¹ Departamento de Salud Pública, Universidad Miguel Hernández, Campus San Juan, Spain

² CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

³ Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP), Valencia, Spain

⁴ Conselleria de Sanidad

Corresponding author: Jesus Vioque. Departamento de Salud Pública, Campus San Juan. Universidad Miguel Hernández. Ctra. Nacional 332 s/n 03550-Sant Joan d'Alacant España

Abstract

Objective: To examine the reproducibility and validity (biochemical calibration) of a semi-quantitative food frequency questionnaire (FFQ) in pregnant women.

Methods: Participants were 740 pregnant women from a population-based birth cohort study in Valencia (INMA Study). Women were interviewed at week 12 and 32 using a 100-food item FFQ and additional questions for supplement use. We compared nutrient and food intakes in two periods of pregnancy (reproducibility), and compared energy-adjusted intake of several carotenoids, folate, vitamin B12, vitamin C and α -tocopherol by the FFQ in the first trimester with measurement of the corresponding nutrient level in blood specimens (biochemical calibration).

Results: The daily mean intake of energy and most nutrients was slightly lower in the second period of pregnancy although the mean intake of lycopene, iron and vitamin D was significantly higher ($p < 0.01$). Significant correlations between both FFQ (reproducibility) were found for all major food groups and nutrients but not for lycopene ($r = 0.06$); the average correlation coefficients for daily intake were 0.51 for food groups and 0.61 for nutrients. Although correlations between nutrient intakes by the first FFQ and their respective plasma levels were low for retinol, lycopene, α -tocopherol, vitamin B12 and folate (≤ 0.12), higher and statistically significant correlations were observed for vitamin C (0.18), α -carotene (0.32), β -carotene (0.22), lutein-zeaxanthin (0.29) and β -Cryptoxanthin (0.26). When dietary supplement use was taken into account, correlations were substantially improved for folate (0.53) and to a lesser extent for vitamin B12 (0.12) and vitamin C (0.20).

Conclusion: The FFQ showed good reproducibility for most nutrients and food groups during pregnancy and a reasonable validity for several relevant nutrients during early pregnancy.

INTRODUCTION

Nutrition during pregnancy plays an important role in the well-being of the mother and fetus, and may further influence the health of the children later in life (Godfrey and Barker 2001, Harding 2001). The ability to assess the role of a complex exposure such as maternal diet during pregnancy requires valid instruments.

Food records and 24-hour dietary recalls may provide accurate information about diet, although they are expensive to administer and analyze in epidemiological studies and food records require a high level of cooperation and literacy (Willett, 1998). In addition, several days would be required to evaluate the long-term intake of foods and nutrients which makes them less feasible.

At present, the food frequency questionnaire (FFQ) is the preferred dietary assessment method in most epidemiological studies mainly due to its low cost and ease of administration and, therefore, they have been validated in many different populations (Henríquez-Sánchez et al 2009, Willett 1998). However, FFQ have been less often validated to assess diet during pregnancy, a period when many dietary changes occur and the use of dietary supplements is common (Ortiz-Andrellucchi et al 2009). The most frequently used reference methods to validate FFQ have been food records and 24-hour recalls (Cade et al 2002) although their use in pregnancy may be more limited because of the frequent use of dietary supplement. Thus, biomarkers for nutrients intake may be an alternative reference method to validate some nutrient intakes since their measurement errors are independent from those of FFQ (Bingham 2002, Hunter 1998)

In this study, as part of an ongoing study, the INMA Project, aimed to investigate the role of environmental pollutants in air, water and diet during pregnancy and early childhood in relation to child growth and development (Ribas-Fitó et al 2006; Guxens 2011), we evaluated the reproducibility of a semi-quantitative FFQ for assessing usual dietary intake during pregnancy; we also examined the validity for the assessment of the usual intake of several nutrients during early pregnancy by comparing dietary intakes estimated by the FFQ with blood levels of these nutrients.

METHODS

Study population

Participants were 740 healthy pregnant women from a mother and child prospective cohort study in Valencia, a subproject of the INMA Project started in Spain in 2003 (Ribas-Fitó et al 2006; Guxens 2011). Details of the recruitment and follow-up have been described previously (Ramón et al 2009, Rodríguez-Bernal et al 2010). Briefly, pregnant women from a well-defined geographic area in the Valencia province, attending the first prenatal visit in La Fe Hospital, were recruited before week 13 of gestation. Of the 840 women initially enrolled in the study between February 2004 and June 2005, 787 gave birth to a singleton live infant between May 2004 and February 2006. The final analysis was based on 740 women who completed the FFQ at weeks 12 and 32 of pregnancy and provided blood samples for the validation study. All subjects gave informed consent to participate in the study. The study protocol was approved by the Ethics Committee of La Fe Hospital (Valencia, Spain).

Dietary assessment: Semiquantitative Food Frequency Questionnaire.

We used a semi-quantitative FFQ of 100 food items to assess the usual daily intake of foods and nutrients. The FFQ was a modified version from a previous FFQ based on the Harvard questionnaire (Willett et al 1985), which we developed and validated using four 1-week dietary records in an adult population in Valencia. The validity and reproducibility correlation coefficients (adjusted for energy intake) ranged from 0.38 for reproducibility of carotenoids to 0.44 for validity of vitamin C (Vioque and Gonzalez 1991, Vioque 2006); this is a similar range to other established diet questionnaires (Willett, 1998, Henríquez-Sánchez et al 2009). For the dietary assessment of pregnant women in the INMA cohort study, we added additional food items in the FFQ in order to capture the major sources of the most relevant nutrients, including specific carotenoids.

Participants in the study were asked twice during pregnancy how often, on average, they had consumed each food item over two periods of several months. The first period covered from the last menstrual period to the first prenatal visit that occurred between the 10th and the 13th gestation week; the second period was the time elapsed between the first visit and the second one between the 28th and 32nd gestation week. Serving sizes were specified for each food item in the FFQ. The questionnaire had nine possible responses, ranging from

‘never or less than once per month’ to ‘six or more per day’. Additionally, we asked whether study participants followed special diets, and we included several questions on the use of vitamins and other dietary supplements (by type and frequency) during both periods of pregnancy.

Nutrients values were primarily obtained from the food composition tables of the US Department of Agriculture publications and other published sources (USDA 2010; Palma I 2008). In order to obtain average daily nutrient intakes from diet for each individual, we multiplied the frequency of use for each food by the nutrient composition of the portion/serving size specified on the FFQ and added the results across all foods. In addition to the FFQs, we incorporated questions to identify the date of first use, frequency (times/week), dose and brand names of supplements which allowed us to estimate the daily nutrient intake of supplements for each period of pregnancy. Thus, for those nutrients often used in supplements during pregnancy such as folate, vitamin C and vitamin B12, the total daily nutrient intake was estimated by adding the average daily intake from supplements and the usual daily nutrient intake from the FFQ. In order to convert folic acid intake from supplements to dietary folate, we used the equivalence of 1 mcg of folate in the diet equals to 0.6 mcg of folic acid from supplements (Eichholzer et al 2006). We estimated the mean daily consumption for 18 food groups by grouping the intake of specific foods in the FFQ (table 2)

Biomarkers

Nonfasting blood samples were obtained from each participant during the first visit and analysed in a central laboratory (Queen’s University, Belfast). All participants were instructed by the interviewers not to consume fruits, vegetables or juice for breakfast on the day of the blood test. A thorough protocol was designed to collect, transport and measure the blood samples for vitamin C, E, B12, folate and carotenoids. Blood samples were separated by centrifugation and stored at -80° C. The blood samples for vitamin C determination were collected at clinical examination under subdued light, were wrapped in tin foil, stabilized with meta-phosphoric acid and placed in insulated dry containers at 4°C to exclude light and, therefore, avoid vitamin C degradation. Blood samples packed in dry ice were shipped to the central laboratory by dedicated couriers. Plasma cholesterol was measured to adjust carotenoid concentrations. Folate and vitamin B12 concentrations in serum were measured using a commercially available radioassay (SimulTRAC-SNB ICN Pharmaceuticals, California, USA). Serum carotenoids were measured by HPLC with

diode array detection as described by Craft (1992). Lutein+zeaxanthin plasma concentrations were combined because information for these nutrients is combined in the main food composition tables. Plasma vitamin C was measured using an ascorbate oxidase-based assay as described by Vuillemier & Keck (1989). The inter-assay CV were <10.0% and intra-assay CV<5.0% for all species. The assays were standardized against the appropriate National Institute of Standards and Technology standard reference materials.

Statistical Analysis

Data analyses were performed with the STATA statistical software package (version 9; StataCorp, College Station, TX). Means and standard deviations for total nutrient intakes and food consumption from the FFQ, and for biomarkers were calculated. We used paired Student's test for means comparison of the individual daily nutrient intakes and food consumption reported in the two periods.

All nutrient and food group intakes were log-transformed prior to analysis to improve their normality. Energy-adjusted intakes were computed using the residual method, where each nutrient is regressed on total calories, and the population mean was then added back to the calculated residuals (Willett et al 1985). Since most carotenoids are transported in plasma lipoproteins, plasma concentrations of carotenoids were also adjusted per plasma cholesterol concentrations using the residual method.

To assess the reproducibility of the FFQ, we estimated Pearson correlations to compare the individual energy-adjusted dietary intakes of nutrients and foods reported from the first and second interviews. Pearson correlations were also used to evaluate the validity of the FFQ by comparing individual energy-adjusted dietary intakes from the first FFQ and their respective plasma concentrations of the nutrients vitamin C, E, B12, folate and carotenoids (α - carotene, β - carotene, lutein + zeaxanthin, lycopene and β -cryptoxanthin). Spearman correlations coefficients were also estimated although the results were very similar to those observed for parametric correlations, therefore, only Pearson correlations are presented. Separate analyses were performed by supplement use (yes/no).

RESULTS:

Table 1 presents the main characteristics of the 740 pregnant women. 45.4% of women were under 30 years of age, 88.0% were born in Spain, 28.9 were overweight or obese before pregnancy, and the mean gestational age was 39.5 weeks. Supplement use of folic acid and vitamins B12 and C during pregnancy was reported by 95.4%, 87.9% and 49.6% of women, respectively.

Mean daily intakes of nutrients and food groups based on the FFQs are presented in table 2. In general, lower mean energy and nutrient intakes were observed in the second period of pregnancy although not so for some carotenoids (eg., lycopene 12% less), vitamin C and D, and calcium. The Pearson correlation coefficients for nutrients estimated by the two FFQ are also presented in table 2. Highly significant correlations were observed for most nutrients, ranging from $r=0.14$ for lycopene to $r=0.70$ for iodine. The average of correlation coefficients was 0.51. When the analysis was based on energy adjusted nutrient intakes, the magnitude of correlations coefficients was reduced for most nutrients although they were all statistically significant except for lycopene.

Regarding food group intake, the mean intake for eight food groups estimated by the second FFQ was significantly lower than by the first FFQ (red meat, processed meat, seafood, legumes, cereals and pasta, bread, potatoes and vegetable fat) whereas the consumption of dairy products and fruits was significantly higher (Table 2). The correlation coefficients of food groups between the two FFQ were in general lower than those observed for nutrients, ranging from $r=0.22$ for animal fat and $r=0.61$ for vegetables. The average correlation of absolute food group intakes between the two FFQ was $r=0.39$. As for nutrients, the energy-adjusted correlations for food groups were slightly lower than unadjusted correlations although all of them were statically significant (except for animal fat).

Table 3 shows the mean daily intake and plasma concentration for ten nutrients, and the correlation coefficients between the first FFQ and plasma concentration (validity). The correlation coefficients based on energy-adjusted nutrient intakes and cholesterol adjusted plasma concentrations were higher than the unadjusted. The lowest coefficients were observed for lycopene ($r=0.04$), retinol ($r=0.05$) and vitamin E ($r=0.05$) and the highest for β -carotene ($r=0.32$). The average correlation coefficient for energy-adjusted nutrients was $r=0.16$. When correlation analyses were performed for total nutrient intakes of folic acid,

vitamin B12 and C (i.e., based on the intake from diet and supplements), correlation coefficients improved substantially, particularly for folate, from 0.12 to 0.53 (Table 3). The average correlation coefficient for total nutrient intake of folate, vitamin B12 and C was $r=0.28$.

According to classification into quintiles of nutrient intakes, between 52.8% (lycopene) and 80.1% (iodine) of women were classified in the same or adjacent quintile (Table 4).

Regarding food groups intake, between 58.5% (fruits) and 72.2% (seafood) of women were classified in the same or adjacent quintiles by both FFQ (energy adjusted intakes). Extreme misclassification was lower than 20% for all nutrients and food groups except for lycopene (21.1%)



DISCUSSION

The results of the present study indicate that the intakes of nutrients and food groups estimated from the FFQ to assess diet assessment among pregnant women of the INMA Project were reasonably reproducible and valid estimates. The correlation coefficient values observed in the present study were similar and comparable for most of the nutrients and food groups to those observed in other validation studies evaluating FFQ performance among pregnant women and other populations (Ortiz-Andrellucchi, 2009; Willett 1998).

This validation study was undertaken because a new FFQ was developed for assessment the dietary intakes of pregnant women in study INMA-Project, a prospective cohort study of mothers and children. The reproducibility was explored by comparing the results from the FFQ at two different periods in pregnancy and the validity of the FFQ by comparing the nutrient intakes and biomarker concentrations of several nutrients. The use of biochemical measures for calibration of the questionnaire is appropriate since the two methods of assessing diet have different sources of error that are unlikely to be correlated with each other (Bingham 2002, Hunter 1998). We selected nutrients that are important for perinatal research and that are sensitive to dietary intake (carotenoids, folate, vitamin B12 and C, E and retinol).

Overall, the FFQ showed to be a reliable tool to reproducibility among Spain pregnant women. In the literature, there were a few studies presented data on the reproducibility of their FFQs (Baer et al 2005, Erkkola et al 2001, Pinto et al 2010, Suitor et al 1989). In our study, the average of correlation coefficients between two FFQ was 0.51 for nutrient intakes. Suitor et al described very similar results, except for a stronger vitamin A correlation (Suitor et al 1989). In a Finnish study (Erkkola et al 2001) the reproducibility coefficients were on average 0.66 versus 0.53 for our study for all nutrients considered in both studies. In a recent Portuguese study published in 2010 the reproducibility coefficients on average were similar results. As our result some reproducibility studies reported higher intake estimated with the first FFQ (Erkkola et al 2001, Suitor et al 1989). As far as we know, only one study has explored reproducibility of food groups by FFQ among pregnant women (Erkkola et al 2001) although we cannot compare results directly since foods were not grouped in the same foods group. However, the average of the correlations coefficients observed for food groups were very similar to those observed in

the Finish Study, and slightly lower than those reported in other non-pregnant populations (Willett 1998).

Poor correlations were found between dietary intake and plasma concentrations of retinol, and α -tocopherol ($r=0.05$). This result is in agreement with studies in pregnant women (Brantsaeter et al 2007, Mikkelsen et al 2006, Scaife et al 2006) as well as non-pregnant population (Willett et al 1983a). The retinol concentrations in plasma is highly regulated by liver stores over a wide range of dietary intakes that can only found mainly in subjects with either severely depleted or highly saturated liver stores (Willett et al 1983b).

Likewise, correlations of tocopherol were found for sharp high intakes of this nutrient (Willett et al 1983b).

To our knowledge, the correlations between dietary intake and plasma concentration for lycopene, vitamin B12, α -carotene, lutein-zeaxantin and β -Cryptoxantin have been showed for first time in the pregnant population (Ortiz-Andrellucchi et al 2009). The correlations between the estimates of nutrient intakes from the FFQ and their plasma concentration were slightly higher than those found in a previous study in which a similar FFQ used in an elderly population of our area (Vioque et al 2007). The correlation coefficients were substantially improved for folate (from $r=0.12$ to $r=0.53$) and to lesser extent for Vitamin B12 (0.12) and vitamin C (0.20) when dietary supplement use was considered. In Spain, the contribution of vitamin B12 from supplements to the total intake of this vitamin is probably low although it may be included in some folic acid and other multivitamin supplements, and therefore may influence the total dietary intake for this vitamin in some periods of pregnancy (Navarrete-Muñoz et al 2010).

Other methods of dietary assessment such as food diaries or 24 hours recalls are commonly used in validation studies of FFQ, and this may be a limitation of this study. However, the use of these two methods may be more problematic and unfeasible during pregnancy since the dietary changes during pregnancy (Add proportion of women vomiting?).

On the other hand, this is the first study ever done to validate a FFQ among pregnant women in Spain and the sample size was big enough to detect as statistically significant small coefficient correlations. IN addition when we used the mean of nutrient intakes estimated by the two FFQ, the correlation coefficients of validity were improved for many nutrients, particularly for lycopene (from 0.04 to 0.20, $p<0.01$). Still the lack of validity for

retinol and vitamin E deserves attention when using this FFQ in the study of diet disease relationships.

In conclusion, the reproducibility and relative validity of the FFQ assessed in this study were comparable with the results of earlier studies. We conclude that our questionnaire is a reasonably good method for assessing the diet of pregnant women in the prospective INMA cohort study to explore potential effects of diet on reproductive outcomes and the future development child after birth.



REFERENCES:

Anderson D, Hollis B, LeVine B, Pittard W (1988). Dietary assessment of maternal vitamin D intake and correlation with maternal and neonatal serum vitamin D concentrations at delivery. *J Perinatol* 8: 46-48.

Baer H, Blum R, Rockett H, Leppert J, Gardner J, Sutor C et al (2005). Use of a food frequency questionnaire in American Indian and Caucasian pregnant women: a validation study. *BMC Public Health* 5: 135.

Bingham S (2002). Biomarkers in nutritional epidemiology. *Public Health Nutr* 5: 821-827.

Brantsaeter A, Haugen M, Alexander J, Meltzer H (2008). Validity of a new food frequency questionnaire for pregnant women in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Matern Child Nutr* 4: 28-43.

Brantsaeter AL, Haugen M, Hagve TA, Aksnes L, Rasmussen SE, Julshamn K et al (2007). Self-reported dietary supplement use is confirmed by biological markers in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Ann Nutr Metab* 51: 146-154.

Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D (2002). Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires - a review. *Public Health Nutr* 5: 567-587.

Daltveit A, Vollset S, Lande B, Øien H (2004). Changes in knowledge and attitudes of folate, and use of dietary supplements among women of reproductive age in Norway 1998-2000. *Scand J Public Health* 32: 264-271.

Eichholzer M, Tönz O, Zimmermann R (2006). Folic acid: a public-health challenge. *Lancet* 367: 1352-1361.

Erkkola M, Karppinen M, Javanainen J, Räsänen L, Knip M, Virtanen S (2001). Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire for pregnant Finnish women. *Am J Epidemiol* 154: 466-476.

Fawzi W, Rifas-Shiman S, Rich-Edwards J, Willett W, Gillman M (2004). Calibration of a semi-quantitative food frequency questionnaire in early pregnancy. *Ann Epidemiol* 14: 754-762.

Godfrey K, Barker D (2001). Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr* 4: 611-624.

Guxens M, Ballester F, Espada M, Fernández MF, Grimalt JO, Ibarluzea J, Olea N, Rebagliato M, Tardón A, Torrent M, Vioque J, Vrijheid M, Sunyer J; on behalf of INMA Project. Cohort Profile: The INMA--INfancia y Medio Ambiente--(Environment and Childhood) Project. *Int J Epidemiol*. 2011 Apr 5 (Epub ahead of print)

Harding JE (2001). The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol* 30: 15-23.

Henríquez-Sánchez P, Sánchez-Villegas A, Doreste-Alonso J, Ortiz-Andrellucchi A, Pfrimer K, Serra-Majem L (2009). Dietary assessment methods for micronutrient intake: a systematic review on vitamins. *Br J Nutr* 102 Suppl 1: S10-37.

Hunter D (1998). Biochemical indicators of dietary intake. In: Willet W (ed). *Nutritional Epidemiology*. Oxford University Press: New York, Oxford. pp 174-243.

Maats F, Crowther C (2002). Patterns of vitamin, mineral and herbal supplement use prior to and during pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 42: 494-496.

Martínez-Frías ML, Rodríguez-Pinilla E, Bermejo E (2003). Análisis de la situación en España sobre el consumo de ácido fólico/folinato cálcico para la prevención de defectos congénitos. *Med Clin(Barc)* 121: 772-775.

Mikkelsen T, Osler M, Olsen S (2006). Validity of protein, retinol, folic acid and n-3 fatty acid intakes estimated from the food-frequency questionnaire used in the Danish National Birth Cohort. *Public Health Nutr* 9: 771-778.

Navarrete-Muñoz EM, Giménez Monzó D, García de La Hera M, Climent MD, Rebagliato M, Murcia M et al (2010). [Folic acid intake from diet and supplements in a population of pregnant women in Valencia, Spain]. *Med Clin (Barc)* 135: 637-643.

Olsen S, Hansen H, Sandström B, Jensen B (1995). Erythrocyte levels compared with reported dietary intake of marine n-3 fatty acids in pregnant women. *Br J Nutr* 73: 387-395.

Ortiz-Andrellucchi A, Doreste-Alonso J, Henríquez-Sánchez P, Cetin I, Serra-Majem L (2009). Dietary assessment methods for micronutrient intake in pregnant women: a systematic review. *Br J Nutr* 102 Suppl 1: S64-86.

Palma I, Farran A, Canto S. *Tablas de Composición de Alimentos por Medidas Caseras de Consumo Habitual en España. [Food Composition Tables for Common Household Measures in Spain.]* CESNID. Madrid, Spain: McGraw-Hill Interamerican, 2008 (in Spanish)

Parra M, Schnaas L, Meydani M, Perroni E, Martínez S, Romieu I (2002). Erythrocyte cell membrane phospholipid levels compared against reported dietary intakes of polyunsaturated fatty acids in pregnant Mexican women. *Public Health Nutr* 5: 931-937.

Pinto E, Severo M, Correia S, dos Santos Silva I, Lopes C, Barros H (2010). Validity and reproducibility of a semi-quantitative food frequency questionnaire for use among Portuguese pregnant women. *Matern Child Nutr* 6: 105-119.

Ramón R, Ballester F, Iñiguez C, Rebagliato M, Murcia M, Esplugues A et al (2009). Vegetable but not fruit intake during pregnancy is associated with newborn anthropometric measures. *J Nutr* 139: 561-567.

Ribas-Fitó N, Ramón R, Ballester F, Grimalt J, Marco A, Olea N et al (2006). Child health and the environment: the INMA Spanish Study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 20: 403-410.

Rodríguez-Bernal CL, Rebagliato M, Iñiguez C, Vioque J, Navarrete-Muñoz EM, Murcia M et al (2010). Diet quality in early pregnancy and its effects on fetal growth outcomes: the Infancia y Medio Ambiente (Childhood and Environment) Mother and Child Cohort Study in Spain. *Am J Clin Nutr* 91: 1659-1666.

Rondó P, Villar B, Tomkins A (1999). Vitamin A status of pregnant women assessed by a biochemical indicator and a simplified Food Frequency Questionnaire. *Arch Latinoam Nutr* 49: 322-325.

Scaife AR, McNeill G, Campbell DM, Martindale S, Devereux G, Seaton A (2006). Maternal intake of antioxidant vitamins in pregnancy in relation to maternal and fetal plasma levels at delivery. *Br J Nutr* 95: 771-778.

Suitor CJ, Gardner J, Willett WC (1989). A comparison of food frequency and diet recall methods in studies of nutrient intake of low-income pregnant women. *J Am Diet Assoc* 89: 1786-1794.

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2010. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>

Vioque J, Weinbrenner T, Asensio L, Castelló A, Young I, Fletcher A (2007). Plasma concentrations of carotenoids and vitamin C are better correlated with dietary intake in normal weight than overweight and obese elderly subjects. *Br J Nutr* 97: 977-986.

Willett W, Sampson L, Stampfer M, Rosner B, Bain C, Witschi J et al (1985). Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Am J Epidemiol* 122: 51-65.

Willett W (1998). *Nutritional Epidemiology* (2nd ed.). New York: Oxford University Press.

Willett WC, Stampfer MJ, Underwood BA, Speizer FE, Rosner B, Hennekens CH (1983a). Validation of a dietary questionnaire with plasma carotenoid and alpha-tocopherol levels. *Am J Clin Nutr* 38: 631-639.

Willett WC, Stampfer MJ, Underwood BA, Taylor JO, Hennekens CH (1983b). Vitamins A, E, and carotene: effects of supplementation on their plasma levels. *Am J Clin Nutr* 38: 559-566.

Table 1. Characteristics of study participants. The INMA-Valencia cohort study (N=740)

Characteristics	Subjects (%)
Maternal age	
≤ 29 years	336 (45.4)
30-34 years	285 (38.5)
>35 years	119 (16.1)
Education	
≤Primary School	249 (33.6)
Secondary School	314 (42.4)
University	177 (23.9)
Country of origin	
Spain	651 (88.0)
Other countries	89 (12.0)
Socioeconomic status	
I+II	118 (15.9)
III	178 (24.1)
IV+V	444 (60.0)
Pre-pregnancy body mass index	
< 25 kg/m ²	526 (71.1)
25-30 kg/m ²	139 (18.8)
≥ 30 kg/m ²	75 (10.1)
Smoking during pregnancy	
No	439 (59.3)
First trimester	128 (17.3)
All pregnancy	173 (23.4)
Alcohol intake	
None	518 (70.0)
0-1 g/d	146 (19.7)
>1 g/d	76 (10.3)
Gestational age (weeks) (<i>Missing=6</i>)	39.5 (1.7)
Gestational weight gain (<i>missing=13</i>)	
Normal	261 (35.9)
Low	179 (24.6)
High	287 (39.5)
Parity	
0	407 (55.0)
≥1	333 (45.0)
Medical problems in previous pregnancies ^c (<i>missing=6</i>)	
No	584 (79.6)
Yes	150 (20.4)
Use of folic acid-containing supplements (<i>Missing=32</i>)	
No	33 (4.6)
Yes	675 (95.4)
Use of vitamin C-containing supplements (<i>Missing=220</i>)	
No	373 (50.4)
Yes	367 (49.6)
Vitamin B12-containing supplement use	
No	89 (12.0)
Yes	651 (87.9)

^c Spontaneous abortion, stillborn offspring, previous pre-term and low birth weight births and congenital malformations.

Table 2. Mean daily intakes of nutrients and foods groups based on the Food Frequency Questionnaire (FFQ) completed in two moments by pregnancy women of the INMA-Valencia cohort study (n=740)

	FFQ1 Mean (SD)	FFQ2 Mean (SD)	<i>p</i> -value ^a	Pearson correlation coefficient	
				<i>r</i> ^b	<i>r</i> ^c adjusted
Nutrients					
Energy (kcal/day)	2304 (587)	2212 (633)	<0.001	0.58**	
Protein (g/day)	102 (25)	99 (27)	<0.001	0.53**	0.49**
Total carbohydrates (g/day)	261 (81)	253 (86)	0.005	0.57**	0.36**
Dietary fiber (g/day)	24 (8)	22 (8)	<0.001	0.48**	0.43**
Cholesterol	340 (109)	332 (113)	0.070	0.48**	0.35**
Total fat (g/day)	99 (29)	93 (31)	<0.001	0.50**	0.35**
Saturated fatty acids (g/day)	31 (11)	30 (11)	0.026	0.51**	0.38**
Monounsaturated fatty acids (g/day)	46 (14)	43 (14)	<0.001	0.46**	0.35**
Polyunsaturated fatty acids (g/day)	15 (6)	14 (7)	0.001	0.49**	0.35**
Omega 3	1.6 (0.5)	1.5 (0.5)	<0.001	0.53**	0.50**
Omega 6	13 (6)	12 (6)	0.001	0.49**	0.35**
Retinol (µg/day)	812 (819)	844 (781)	0.335	0.51**	0.53**
α- carotene (µg/day)	536 (468)	532 (525)	0.859	0.50**	0.51**
β- carotene (µg/day)	4499 (2438)	4553 (2665)	0.583	0.55**	0.56**
Lutein + Zeaxanthin (µg/day)	3157 (2455)	3091 (2381)	0.453	0.59**	0.59**
Lycopene (µg/day)	4410 (2727)	5004 (3763)	<0.001	0.14**	0.06
β- Cryptoxanthin (µg/day)	360 (253)	362 (263)	0.851	0.38**	0.36**
Vitamin B6 (mg/day)	2.1 (0.7)	2.1 (0.8)	0.684	0.53**	0.50**
Folato (µg/day)	305 (99)	297 (106)	0.034	0.52**	0.48**
Vitamin B12 (µg/day)	9.9 (5.7)	9.7 (5.5)	0.335	0.46**	0.43**
Vitamin C (mg/day)	144 (83)	143 (86)	0.720	0.45**	0.44**
Vitamin D	3.1 (1.9)	3.3 (2.1)	0.009	0.55**	0.52**
Vitamin E (mg/day)	11.4 (4.1)	10.8 (4.5)	0.001	0.45**	0.37**
Calcium	1289 (429)	1320 (455)	0.060	0.51**	0.49**
Iron	21 (6)	20 (6)	<0.001	0.53**	0.40**
Magnesium	387 (105)	383 (107)	0.215	0.69**	0.57**
Sodium	3411 (996)	3171 (1043)	<0.001	0.49**	0.33**
Zinc	28 (7)	26 (7)	<0.001	0.52**	0.40**
Iodine ^d	222 (88)	226 (84)	0.151	0.70**	0.72**
Food groups					
Dairy Products (g/day)	468 (245)	520 (262)	<0.001	0.55**	0.44**
Eggs (g/day)	20 (10)	21 (11)	0.288	0.39**	0.36**
White meat (g/day)	33 (18)	32 (23)	0.129	0.38**	0.37**
Red meat (g/day)	60 (32)	54 (29)	<0.001	0.40**	0.36**
Processed meat (g/day)	42 (33)	39 (33)	0.034	0.36**	0.33**
Lean fish (g/day)	25 (20)	25 (20)	0.264	0.36**	0.36**
Fatty fish (g/day)	28 (23)	28 (24)	0.857	0.41**	0.41**
Seafood (g/day)	11 (11)	10 (9)	<0.001	0.43**	0.40**
Fruits (g/day)	293 (204)	320 (217)	0.004	0.41**	0.38**
Vegetables (g/day)	216 (121)	213 (126)	0.554	0.61**	0.62**
Nuts (g/day)	6 (11)	5 (7)	0.003	0.23**	0.17**
Legumes (g/day)	31 (25)	28 (23)	0.005	0.39**	0.38**
Cereals and Pasta (g/day)	119 (51)	114 (49)	0.015	0.48**	0.43**
Bread (g/day)	103 (72)	86 (65)	<0.001	0.38**	0.35**
Potatoes (g/day)	60 (38)	55 (37)	0.001	0.39**	0.33**
Sweets and sugar (g/day)	53 (44)	54 (48)	0.438	0.44**	0.37**
Animal Fat (g/day)	0.6 (1.9)	0.5 (1.4)	0.669	0.22*	0.18
Vegetable Fat (g/day)	24 (14)	22 (14)	<0.001	0.30**	0.30**

^a *p*-value from paired t-test; ^b Nutrient intakes were log-transformed; ^c Adjusted for total energy intake; ^d Iodine intake from diet and use of iodized salt; * *p* <0.05 level; ** *p* <0.01 level

Table 3. Dietary intake and plasma concentrations and Pearson correlations between plasma nutrient concentrations and dietary intake pregnant women of the INMA Valencia cohort study (N=740)

Nutrients	FFQ1 Mean (SD)	Plasma concentration Mean (SD)	Pearson correlations coefficient between FFQ1 and Plasma Concentrations	
			r^a	r^b adjusted
Retinol (µmol/l)	812 (819)	1.78 (0.54)	0.02	0.05
α- carotene (µmol/l)	536 (468)	0.15 (0.14)	0.31**	0.32**
β- carotene (µmol/l)	4499 (2438)	0.40 (0.30)	0.21**	0.22**
Lutein + Zeaxanthin (µmol/l)	3157 (2455)	0.32 (0.13)	0.26**	0.29**
Lycopene (µmol/l)	4410 (2727)	0.72 (0.62)	0.05	0.04
β- Cryptoxanthin (µmol/l)	360 (253)	0.22 (0.15)	0.26**	0.26**
Vitamin E (µmol/l)	11.4 (4.1)	33 (7)	0.01	0.05
Folate (mmol/dl)	304 (100)	80 (211)	0.06	0.12**
Diet+supplements (n=708) ^c	1616 (2385)	80 (211)	0.53**	0.53**
Vitamin B12 (pmol/l)	9.9 (5.7)	322 (121)	0.08*	0.08*
Diet+supplements (n=740) ^c	12.0 (12.2)	322 (121)	0.11**	0.12**
Vitamin C (µmol/l)	144 (83)	50 (22)	0.16**	0.18**
Diet+supplements (n=520) ^c	157 (84)	50 (22)	0.18**	0.20**

^a Nutrient intakes were log-transformed

^b Adjusted for total energy intake and plasma carotenoids adjusted for total cholesterol

^c Total nutrient intake from diet and supplements. Folic acid from supplements were converted to dietary folate (0.6 µg FA from supplements =1 µg folate from diet);

*p-value <0.05; **p-value<0.01

Table 4. Joint classification of nutrient and food groups intakes by quintiles in the reproducibility study (comparison of the two food frequency questionnaires).

	Absolute intake		Energy-adjusted intake	
	Correctly classified (%) ^a	Misclassified extremely (%) ^b	Correctly classified (%) ^a	Misclassified extremely (%) ^b
Nutrients				
Energy (kcal/day)	75.4	8.5		
Protein (g/day)	75.8	8.5	68.5	10.9
Total carbohydrates (g/day)	73.8	8.0	65.9	13.6
Dietary fiber (g/day)	68.8	8.6	69.1	8.6
Cholesterol	72.0	9.3	67.6	12.3
Total fat (g/day)	74.2	10.1	63.2	14.7
Saturated fatty acids (g/day)	72.7	9.2	64.5	13.8
Monounsaturated fatty acids (g/day)	69.6	11.6	64.3	16.4
Polyunsaturated fatty acids (g/day)	73.0	9.5	65.9	14.1
Omega 3	71.9	9.5	72.4	11.1
Omega 6	73.0	10.4	66.2	14.5
Retinol (µg/day)	76.2	9.6	77.0	9.1
α-carotene (µg/day)	71.6	8.8	70.8	9.1
β-carotene (µg/day)	72.7	8.8	73.8	8.6
Lutein + Zeaxanthin (µg/day)	75.7	6.9	76.2	7.7
Lycopene (µg/day)	57.7	18.9	52.8	21.1
β-Cryptoxanthin (µg/day)	67.0	13.2	66.2	13.8
Vitamin B6 (mg/day)	73.4	8.4	71.8	10.0
Folate (µg/day)	71.5	8.1	70.5	11.6
Vitamin B12 (µg/day)	70.8	9.6	61.4	10.9
Vitamin C (mg/day)	71.7	10.8	73.1	10.8
Vitamin D	71.5	9.2	72.2	10.4
Vitamin E (mg/day)	70.1	10.0	68.5	13.4
Calcium	71.4	9.5	70.5	8.4
Iron	75.0	8.4	69.1	11.6
Magnesium	72.7	7.0	77.0	6.6
Sodium	72.8	9.7	65.0	15.0
Zinc	74.1	9.5	70.3	11.5
Iodine c	80.5	4.7	80.1	3.6
Food groups				
Dairy Products (g/day)	72.8	9.3	71.4	10.8
Eggs (g/day)	96.2	0	71.4	14.1
White meat (g/day)	78.4	3.5	69.2	15.4
Red meat (g/day)	68.4	12	66.6	13.8
Processed meat (g/day)	66.8	13.4	67.6	13.6
White fish (g/day)	70.9	10	69.6	11.5
Blue fish (g/day)	68.6	12.8	68.6	13.2
Seafood (g/day)	70.8	11.1	72.2	11.5
Fruits (g/day)	59.3	19.1	58.5	18.5
Vegetables (g/day)	59.5	18.2	59.5	17.4
Nuts (g/day)	79.1	6.8	69.7	11.8
Legumes (g/day)	93.0	0	67.3	11.4
Cereals and Pasta (g/day)	71.5	11.5	68.1	12.6
Bread (g/day)	64.3	13.2	66.8	12.2
Potatoes (g/day)	66.9	14.6	64.7	14.3
Sweets and sugar (g/day)	69.5	10.9	66.4	13.1
Animal Fat (g/day)	85.8	0	69.6	17.0
Vegetable Fat (g/day)	64.3	13.5	63.1	14.9

^a Correctly classified into same or adjacent quintiles; ^b Extremely misclassified into opposite quintiles



Grupo EPINUT

El grupo de Epidemiología de la Nutrición (EPINUT), dirigido por el profesor Jesús Vioque, es fruto del desarrollo y confluencia de varias líneas de investigación con un interés común: el estudio de las relaciones dieta-enfermedad. El interés central es la mejora del conocimiento sobre las relaciones entre dieta y enfermedad, principalmente de tipo crónico-degenerativo.

Se definen cuatro líneas de investigación:

- Determinantes nutricionales de la salud.
- Identificación de factores ambientales y genéticos asociados a obesidad.
- Infancia y medio ambiente.
- Análisis de género en problemas de salud relacionados con las conductas de riesgo en la alimentación y el VIH/SIDA.

El grupo colabora en múltiples estudios.

- Encuesta de Nutrición y Salud de Orihuela 1992
- Encuesta Valenciana de Salud y Nutrición 1994
- OBESIGEN
- EUREYE
- PANESOES
- INMA
- BIOMADRID
- DDM
- Estudiantes Universitarios
- CAPUA

- Relación entre la Ingesta de Calcio y Vitamina-D y la densidad ósea a edad infantil en España



Más información sobre el grupo puede ser consultada en
<http://dsp.umh.es/bibliodieta/index.htm>

Proyecto INMA

El desarrollo físico, social e intelectual de los niños, desde su concepción hasta la adolescencia requiere un ambiente protegido para favorecer el desarrollo de su salud.

Existe un número creciente de enfermedades en la infancia asociadas con un entorno contaminado. Las exposiciones prenatales y postnatales incluyendo la dieta se asocian con el desarrollo del niño y lo predisponen a a posibles efectos adversos en la edad adulta.

Los niños son más vulnerables al entorno que los adultos. Los niños no son pequeños adultos sus sistemas están en formación, tienen una inmadurez inmunológica y de los mecanismos de detoxificación, lo que les hace especialmente vulnerables a los riesgos ambientales transmitidos por aire, agua, dieta y suelo.

El proyecto Infancia y Medio Ambiente (INMA) seguirá de manera prospectiva el desarrollo de unos 3500 recién nacidos desde la gestación hasta la adolescencia en varias áreas geográficas.

Se incluirán cohortes que ya se encuentran en marcha y otras de novo. El proyecto INMA pretende transferir metodología y conocimiento entre las distintas cohortes que trabajan en salud ambiental; describir el grado de contaminación individual de compuestos orgánicos persistentes y metales y el grado de exposición durante la gestación y la primera infancia; evaluar el impacto de la exposición a distintos contaminantes y los efectos protectores y negativos de la dieta sobre el crecimiento y el desarrollo del niño; y contrastar las hipótesis generadas de otras cohortes existentes.

Factores nutricionales, biológicos, ambientales y psicosociales durante la gestación y después del nacimiento serán evaluados. Los efectos incluirán el desarrollo intrauterino, el desarrollo neuroconductual, la inmunidad, y la disrupción hormonal.

Objetivos Generales:

1. Compartir metodologías y conocimientos entre diversos grupos españoles que estudian los efectos del medio ambiente en la salud infantil.
2. Describir el nivel de contaminación y de exposición de los niños durante la gestación y la primera infancia.
3. Evaluar el papel de los contaminantes ambientales mayoritarios y los factores protectores de la dieta en el crecimiento fetal y el desarrollo neuro-endócrino-inmunitario.
4. Proveer información útil para la confección de programas de indicadores de salud ambiental y de evaluación de riesgos.

Objetivos Específicos:

- Describir los niveles de metales pesados y compuestos orgánicos persistentes al nacer, la carga de disruptores hormonales, y los niveles de contaminación del interior de las casas y de trihalometanos en agua del grifo durante el primer año de vida en varias zonas geográficas.
- Medir la asociación entre los niveles de contaminación atmosférica del interior, del agua y los niveles de compuestos orgánicos persistentes y el desarrollo intrauterino y el crecimiento antropométrico durante el primer año de vida.
- Medir el papel de la nutrición y la lactancia materna en la asociación entre la exposición a contaminantes y los efectos sobre la salud infantil durante el primer año de vida. Analizar el papel de los distintos alimentos en la dosis interna de compuestos orgánicos persistentes y metales pesados.
- Medir el papel de la disrupción hormonal en la asociación entre los niveles de compuestos orgánicos persistentes al nacer y el desarrollo neuroconductual y sexual durante los primeros 4 años de vida.
- Medir la asociación entre la exposición prenatal y postnatal a contaminantes atmosféricos y del agua y a compuestos orgánicos persistentes y metales pesados y los niveles de inmunoglobulinas a los 4 años de edad.

- Medir la asociación de las exposiciones ambientales al inicio de la vida con la función neurofisiológica a los 7 años.

Objetivos secundarios:

- Promover la formación de los investigadores en comunicación científica con el fin de favorecer la educación ambiental.
- Proveer información útil para la confección de programas de indicadores de salud ambiental y la evaluación del riesgo.
- Promover la participación de la red en proyectos europeos del 6 programa marco.

Web del proyecto: <http://www.proyectoinma.org/>

Bibliografía general del proyecto

Núria Ribas-Fitó, Rosa Ramón, Ferran Ballester, Joan Grimalt, Alfredo Marco, Nicolás Olea, Manuel Posada, Marisa Rebagliato, Adonina Tardón, Maties Torrent, Jordi Sunyer on behalf of the INMA Study Group. Environment and Child's Health: The INMA Spanish Study. Paediatr and Perinat Epidemiology 2006; 20:403-410.

Rosa Ramón, Ferran Ballester, Marisa Rebagliato, Núria Ribas, Maties Torrent, Marieta Fernández, Maria Sala, Adonina Tardón, Alfredo Marco, Manuel Posada, Joan Grimalt, Jordi Sunyer, en nombre de la Red INMA. La Red de Investigación 'Infancia y Medio Ambiente' (Red INMA): protocolo de estudio. Revista Española de Salud Pública 2005; 79:203-20:

Fernandez MF, Sunyer J, Grimalt J, Rebagliato M, Ballester F, Ibarluzea J, Ribas-Fitó N, Tardon A, Fernandez-Patier R, Torrent M, Olea N. The Spanish Environment and Childhood Research Network (INMA study). Int J Hyg Environ Health.. 2007; 210:4 91-3

Guxens M, Ballester F, Espada M, Fernández MF, Grimalt JO, Ibarluzea J, Olea N, Rebagliato M, Tardón A, Torrent M, Vioque J, Vrijheid M, Sunyer J; on behalf of INMA Project. Cohort Profile: The INMA--Infancia y Medio Ambiente--(Environment and Childhood) Project. Int J Epidemiol. 2011 Apr 5 (Epub ahead of print)

Cuestionario de Frecuencia de Alimentos (CFA)

Dpto. Salud Pública, H^o Ciencia y Ginecología-UMH

(Prof. J. Vioque)

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA ALIMENTARIA N^o 2

IDNUM | | | | |

Estimada Sra., esta parte de la encuesta es para conocer la dieta que ha seguido en los últimos meses de su embarazo. Con ello intentamos averiguar el papel que juega la dieta en relación al desarrollo de su embarazo y su futuro hijo. Sus respuestas serán muy útiles, y por ello, le rogamos preste su máxima atención y colaboración. Cuando un alimento no se adapte plenamente a su consumo habitual, trate de aproximar su respuesta a las cantidades indicadas, con la ayuda de los ejemplos e indicaciones que se le den.

Para cada alimento, señalar cuantas veces como media ha tomado la cantidad que se indica desde la última entrevista. Debe tener en cuenta las veces que toma el alimento solo y cuando lo añade a otro alimento o plato. Por ejemplo, en el caso del huevo, considere cuando lo toma solo (Ej. frito o cocido) y cuando lo toma añadido o mezclado con otros platos. Si en estos tres meses ha venido comiendo una tortilla de 2 huevos cada 2 días, deberá marcar "1 por día". No debe considerar el huevo que va con los productos de bollería o dulces.

I. LACTEOS

	Nunca 0 <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
1. Leche entera (1 vaso o taza, 200 cc)	<input type="radio"/>								
2. Leche semi-desnatada (1 vaso, 200cc)	<input type="radio"/>								
3. Leche desnatada (1 vaso, 200cc)	<input type="radio"/>								
4. Leche condensada (1 cucharada)	<input type="radio"/>								
5. Nata o crema de leche (1 cucharada)	<input type="radio"/>								
6. Yogur entero (uno, 125 gramos)	<input type="radio"/>								
7. Yogur desnatado (uno, 125 gramos)	<input type="radio"/>								
8. Requesón, queso blanco o fresco (una porción o ración, 100 g)	<input type="radio"/>								
9. Queso curado, semicurado, o cremoso (un trozo, 50 gramos)	<input type="radio"/>								
10. Natillas, flan, puding (uno)	<input type="radio"/>								
11. Helados (1 cucurucho, vasito o bola)	<input type="radio"/>								

II. HUEVOS, CARNES, PESCADOS

	Nunca 0 <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
12. Huevos de gallina (uno)	<input type="radio"/>								
13. Pollo CON piel (1 plato mediano o pieza)	<input type="radio"/>								
14. Pollo SIN piel (1 plato mediano o pieza)	<input type="radio"/>								
15. Carne de temera, cerdo, cordero como plato principal (1 plato mediano o pieza)	<input type="radio"/>								
16. Carne de caza: conejo, codorniz, pato (1 plato)	<input type="radio"/>								
17. Hígado de temera, cerdo, pollo (1 plato, ración o pieza mediana)	<input type="radio"/>								
18. Vísceras: callos, sesos, mollejas (1 ración, 100 g)	<input type="radio"/>								
19. Embutidos: jamón, salchichón, salami, mortadela, (1 ración de unos 50 g)	<input type="radio"/>								
20. Salchichas y similares (una mediana)	<input type="radio"/>								
21. Patés, foie-gras (media ración, 50 g)	<input type="radio"/>								
22. Hamburguesa (una mediana, 100 g)	<input type="radio"/>								
23. Tocino, beicon, pankoeta (2 tiras o lonchas, 50 g)	<input type="radio"/>								
24. Pescado frito variado (1 plato mediano o ración)	<input type="radio"/>								
25. Pescado hervido o plancha BLANCO: merluza, lenguado, dorada (1 plato o ración)	<input type="radio"/>								
26. Pescado hervido o plancha AZUL: atún, emperador, bonito, (plato o ración)	<input type="radio"/>								
27. Otros pescados azules: caballa, sardinas, boquerón/anchovas, salmón	<input type="radio"/>								
28. Una lata pequeña de conserva de atún o bonito en aceite	<input type="radio"/>								
29. Una lata pequeña de conserva de sardinas o caballa en aceite	<input type="radio"/>								
30. Pescados en salazón y/o ahumados: anchoas, bacalao, salmón (media ración, 50g)	<input type="radio"/>								
31. Almejas, mejillones, ostras (1 ración, 100 g)	<input type="radio"/>								
32. Calamares, chipirones, sepia, choco, pulpo (1 ración o plato, 100 g)	<input type="radio"/>								
33. Marisco: gambas, cangrejo, langostino, langosta (1 ración 100 g)	<input type="radio"/>								

III. VERDURAS, LEGUMBRES.	Nunca 0 <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
34. Espinacas o acelgas cocinadas (1 plato mediano)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
35. Col, coliflor, brócolis cocinadas (1 plato mediano)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
36. Lechuga, endibias, escarola (1 plato mediano)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
37. Tomate (uno mediano)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
38. Cebolla (una mediana)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
39. Zanahoria, calabaza (una o plato pequeño)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
40. Judías verdes cocinadas (1 plato)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
41. Berenjenas, calabacines, pepinos (uno)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
42. Pimientos (uno)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
43. Alcachofas (una ración o plato mediano, 100 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
44. Espárragos (una ración o plato)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
45. Maíz hervido (plato o lata pequeña, 82 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
46. Legumbres: lentejas, garbanzos, judías pintas o blancas (1 plato mediano)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IV. FRUTAS	Nunca 0 <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
47. Naranjas, mandarinas (Una)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
48. Zumo de naranja natural (un vaso pequeño, 125 cc)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
49. Plátano (uno)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
50. Manzana, pera (una mediana)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
51. Melocotón, nectarina, albaricoque (uno mediano)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
52. Sandía, melón (1 tajada o cala, mediana)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
53. Uvas (un racimo mediano o plato de postre)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
54. Prunas, ciruelas frescas/secas (una, 37 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
55. Kiwi (una unidad)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
56. Aceitunas (un platito o tapa de unas 15 unidades pequeñas)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
57. Frutos secos: almendras, cacahuetes, piñones, avellanas (1 platito o bolsita, 30g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
V. PAN, CEREALES Y SIMILARES	Nunca 0 <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
58. Pan blanco (Una pieza pequeña o 3 rodajas de pan de molde, 60 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
59. Pan integral (Pieza pequeña o 3 rodajas de pan de molde)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
60. Cereales desayuno (30 g en seco)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
61. Patatas fritas (1 ración o plato, 100 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
62. Patatas cocidas, asadas (1 patata mediana)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
63. Bolsa de patatas fritas (1 bolsa pequeña, 25-30 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
64. Arroz cocinado (1 plato mediano)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
65. Pastas: espaguetis, fideos, macarrones y similares (1 plato)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
66. Pizza (1 porción o ración, 200 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
VI. ACEITES, GRASAS Y DULCES	Nunca 0 <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
67. Aceite de oliva añadido en la mesa a ensalada, pan y a platos (1 cucharada sopera)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
68. Otros aceites vegetales (ídem): girasol, maíz, soja (1 cucharada sopera)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
69. Margarina añadida al pan o la comida (1 cucharada o untada)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
70. Mantequilla añadida al pan o la comida (1 cucharada o untada)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
71. Galletas tipo María (1 galleta)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
72. Galletas con chocolate (1 galleta doble)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
73. Bollería: croissant, donut, magdalena, bizcocho, tarta o similar (uno o porción)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
74. Chocolate, bombones y similares (1 barrita o 2 bombones)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
75. Chocolate en polvo, cola-caó y similares (1 cucharada sopera)	1	2	3	4	5	6	7	8	9

VII. BEBIDAS Y MISCELANEAS	Nunca 0 <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
76. Vino tinto (1 vaso, 125 cc)	<input type="radio"/>								
77. Vino blanco o rosado (1 vaso, 125 cc)	<input type="radio"/>								
78. Jerez, vinos secos, vermú (copa, 50 cc)	<input type="radio"/>								
79. Cerveza (una caña o botellín 1/5, 200 cc)	<input type="radio"/>								
80. Cerveza sin alcohol (una caña o botellín 1/5, 200 cc)	<input type="radio"/>								
81. Licores (20-25º): de frutas (manzana), de crema (Catalana, Bayleys) (1 copa, 50 cc)	<input type="radio"/>								
82. Brandy, ginebra, ron, whisky, vodka, aguardientes 40º (1 copa, 50 cc)	<input type="radio"/>								
83. Refrescos normales de cola, naranja, limón (ej. coca-cola, fanta) (Uno, 250 cc)	<input type="radio"/>								
84. Refrescos sin azúcar cola, naranja, limón (ej. coca-cola o pepsi light) (Uno, 250 cc)	<input type="radio"/>								
85. Agua del grifo (1 vaso, 250 cc)	<input type="radio"/>								
86. Agua embotellada sin gas (1 vaso, 250 cc)	<input type="radio"/>								
87. Agua embotellada con gas (1 vaso, 250 cc)	<input type="radio"/>								
88. Zumo de frutas envasado (1 vaso o envase de 200cc)	<input type="radio"/>								
89. Café (1 taza)	<input type="radio"/>								
90. Café descafeinado (1 taza)	<input type="radio"/>								
91. Té o infusiones (1 taza)	<input type="radio"/>								
92. Sopa o puré de verduras (un plato)	<input type="radio"/>								
93. Croquetas de pollo, jamón (una)	<input type="radio"/>								
94. Croquetas, palitos o delicias de pescado fritos (una)	<input type="radio"/>								
95. Mayonesa (1 cucharada)	<input type="radio"/>								
96. Salsa de tomate (media taza)	<input type="radio"/>								
97. Ketchup ó catchup (1 cucharada sopera)	<input type="radio"/>								
98. Sal añadida a los platos en la mesa (1 pizca del salero o pellizco con dos dedos)	<input type="radio"/>								
99. Ajo (1 diente)	<input type="radio"/>								
100. Mermeladas, miel (1 cucharada)	<input type="radio"/>								
101. Azúcar (ej. en el café, postres, etc.) (1 cucharadita)	<input type="radio"/>								
¿Consume algún otro alimento regularmente al menos una vez a la semana?	<input type="radio"/>								
-----	<input type="radio"/>								
-----	<input type="radio"/>								

Preguntas sobre suplementación

Consumo de suplementos vitamínicos o minerales. Referido a los meses previos, desde la última entrevista hasta ahora. ¿Ha tomado suplementos de vitaminas o minerales?...

	Marca y presentación	Dosis semanal (comp/sem)	Fecha inicio (mes/año)	¿Sigue tomándolo?	Si no, fecha de finalización
a.	Sal yodada	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
b.	Leche con vit A+D	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
c.	Leche rica en Calcio	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
d.	Fibra/sup ricos en fibra	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
e.	Multivitaminas	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
f.	Acido fólico	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
g.	Complejo A + E	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
h.	Vitamina A	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
i.	Vitamina E	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
j.	Vitamina C	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
i.	Hierro	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
j.	Calcio	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
l.	Complejo B	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
m.	Zinc	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___
n.	Otros Suplementos	-----	___/___/___	<input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No	___/___/___



Macro dieta

El grupo EPINUT, en los últimos años, ha realizado un esfuerzo añadido para elaborar un programa que permita estimar fácil y rápidamente los datos que se recogen en los cuestionarios de frecuencia de alimentos. la ingesta de nutrientes, alimentos, ... ha desarrollado un software específico llamado MaMACRODIETA que permite realizar múltiples estimaciones nutricionales

- Ingesta de alimentos (porciones o en gramos/día).
- Ingesta de nutrientes cruda y ajustada por ingesta energética (método residuos o de Willett).
- Ingesta de grupos de alimentos predeterminados ad hoc.
- Índices de calidad alimentaria: Dieta saludable (aHEI), dieta Mediterránea (AMED).
- Informes individuales de ingestas de acuerdo a recomendaciones.
- Agrupaciones alimentarias y de grupos de individuos.
- Alimentos principales contribuyentes a la ingesta de nutrientes específicos

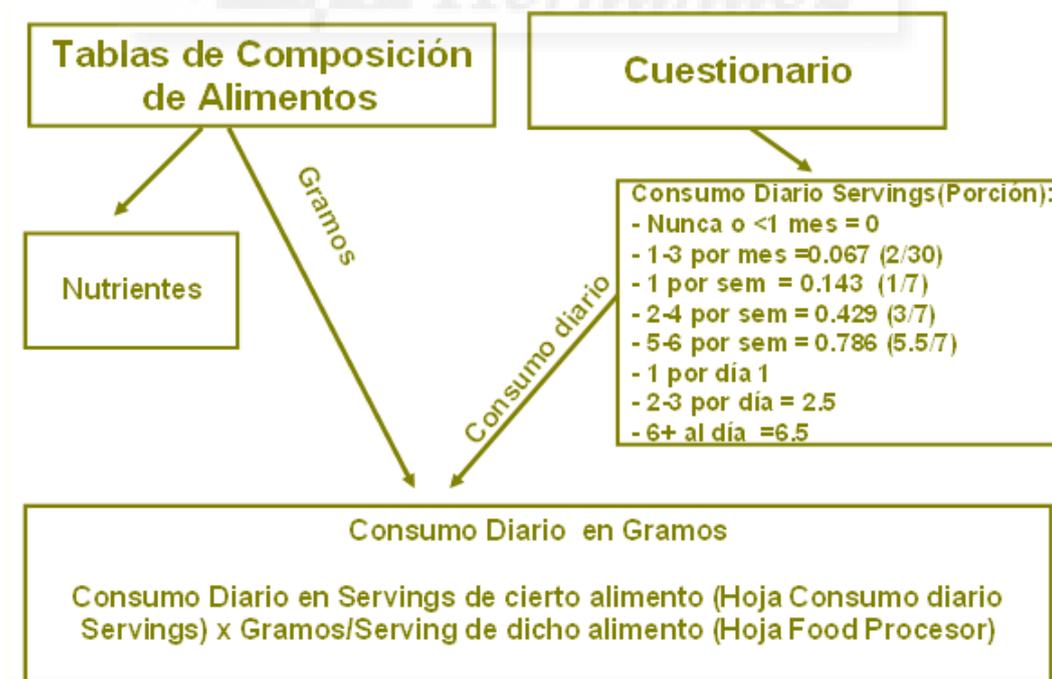


Imagen de la pestaña insertada en Excel y que permite realizar todos los cálculos nutricionales.

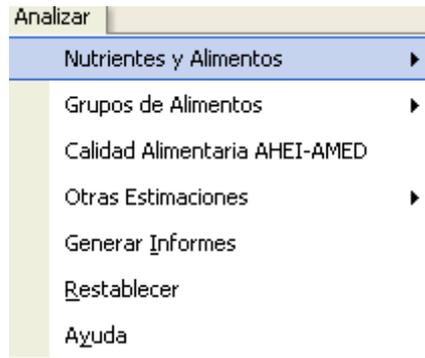


Imagen de la hoja para introducir los cuestionarios en Macrodieta

