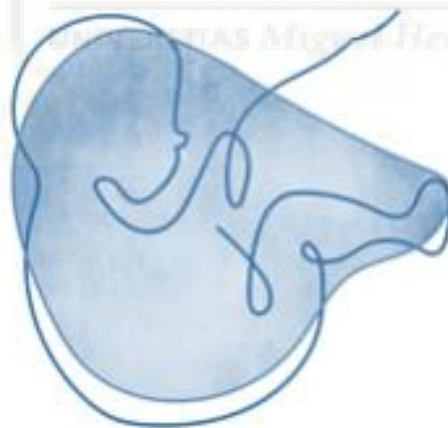




Universidad Miguel Hernández de Elche

Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y  
Quirúrgicas

**Uso de altas y bajas dosis de suplementos de ácido  
fólico durante el embarazo y alteraciones en la función  
cognitiva en niños/as de entre 4 y 9 años del proyecto  
Infancia y Medio Ambiente**



---

Tesis Doctoral

**Laura María Compañ Gabucio**

---

Directora de tesis: **Dra. Manuela García de la Hera**

Codirectora de tesis: **Dra. Laura Torres Collado**

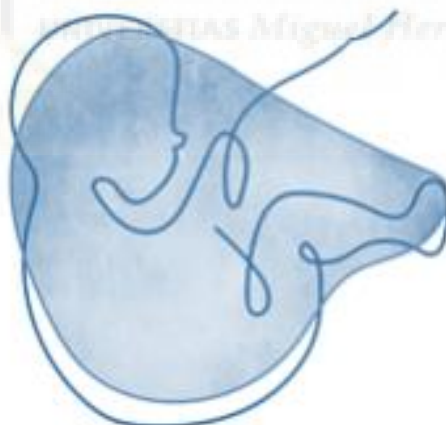




Universidad Miguel Hernández de Elche

Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y  
Quirúrgicas

**Uso de altas y bajas dosis de suplementos de ácido  
fólico durante el embarazo y alteraciones en la función  
cognitiva en niños/as de entre 4 y 9 años del proyecto  
Infancia y Medio Ambiente**



---

Tesis Doctoral

**Laura María Compañ Gabucio**

---

Directora de tesis: **Dra. Manuela García de la Hera**

Codirectora de tesis: **Dra. Laura Torres Collado**

Tutor de tesis: **Dr. Jesús Vioque López**

-2023-



## Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

La presente Tesis Doctoral, titulada “Uso de altas y bajas dosis de suplementos de ácido fólico durante el embarazo y alteraciones en la función cognitiva en niños/as de entre 4 y 9 años del proyecto Infancia y Medio Ambiente”, se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio** de las siguientes **publicaciones**:

### Publicación 1

- Compañ Gabucio LM, García de la Hera M, Torres Collado L, Fernández-Somoano A, Tardón A, Guxens M, Vrijheid M, Rebagliato M, Murcia M, Ibarluzea J, Martí I, Vioque J. The Use of Lower or Higher Than Recommended Doses of Folic Acid Supplements during Pregnancy Is Associated with Child Attentional Dysfunction at 4–5 Years of Age in the INMA Project. *Nutrients*. 2021; 13(2):327. <https://doi.org/10.3390/nu13020327>

### Publicación 2

- Compañ-Gabucio LM, Torres-Collado L, Garcia-de la Hera M, Fernández-Somoano A, Tardón A, Julvez J, Sunyer J, Rebagliato M, Murcia M, Ibarluzea J, Santa-Marina L, Vioque J. Association between the Use of Folic Acid Supplements during Pregnancy and Children’s Cognitive Function at 7–9 Years of Age in the INMA Cohort Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022; 19(19):12123. <https://doi.org/10.3390/ijerph191912123>



Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

La Dra. Dña. *Manuela García de la Hera*, directora, y la Dra. Dña. *Laura Torres Collado*, codirectora de la tesis doctoral titulada “*Uso de altas y bajas dosis de suplementos de ácido fólico durante el embarazo y alteraciones en la función cognitiva en niños/as de entre 4 y 9 años del proyecto Infancia y Medio Ambiente*”.

**INFORMAN:**

Que Dña. *Laura María Compañ Gabucio* ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “*Uso de altas y bajas dosis de suplementos de ácido fólico durante el embarazo y alteraciones en la función cognitiva en niños/as de entre 4 y 9 años del proyecto Infancia y Medio Ambiente*” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral y capacitándole para optar al grado de Doctora.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en San Juan de Alicante a ..... de ..... de 2023.

Directora de la tesis  
Dra. Dña. *Manuela García de la Hera*

Codirectora de la tesis  
Dra. Dña. *Laura Torres Collado*



Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

La Dra. **María del Mar Masiá Canuto**, Coordinadora del **Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas**

**INFORMA:**

Que Dña. *Laura María Compañ Gabucio* ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado “*Uso de altas y bajas dosis de suplementos de ácido fólico durante el embarazo y alteraciones en la función cognitiva en niños/as de entre 4 y 9 años del proyecto Infancia y Medio Ambiente*” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en San Juan de Alicante a ..... de ..... de 2023.

Profa. Dra. D<sup>a</sup>. *María del Mar Masiá Canuto*

**Coordinadora del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas**



*A mi familia.*



*“Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido. Ahora es el momento de comprender más, para temer menos.”*

-Marie Curie

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

-Mahatma Gandhi



# PRESENTACIÓN

---

Mi inicio en el mundo de la investigación se da en el año 2014 gracias a una beca de iniciación a la investigación en el grupo de investigación en Epidemiología de la Nutrición (EPINUT) de la Universidad Miguel Hernández (UMH), liderado por el Profesor Jesús Vioque. A raíz de este primer contacto con la investigación, decido especializarme realizando el Máster Universitario en Salud Pública conjunto UMH/UA, que me aportó las herramientas necesarias, e interés, para querer dedicarme a la investigación como profesión. Gracias a esta formación, tuve la oportunidad de seguir adquiriendo experiencia como becaria en el grupo EPINUT a través de diferentes ayudas, y mejorando mis habilidades de trabajo de campo, digitalización de cuestionarios, análisis de datos y redacción de manuscritos.

En 2017 me considero preparada mental y profesionalmente, además de apoyada por mis directoras y tutor de tesis, para iniciar los estudios de doctorado, que culminan con la elaboración de esta tesis doctoral. Esta tesis se enmarca dentro de una de las líneas de investigación principales del grupo EPINUT, línea que evalúa el efecto de Contaminantes Ambientales y la Dieta en la salud humana en el estudio Infancia y Medioambiente (INMA). Este estudio, es un proyecto multicéntrico cuyo objetivo es evaluar el efecto de contaminantes medioambientales y la dieta en embarazadas y sus hijos e hijas. En concreto, esta tesis se centra en el papel de la dieta en el embarazo, especialmente del uso de suplementos de ácido fólico (sAF), y sus repercusiones en la función cognitiva de los hijos/as. La pregunta de investigación sobre la cual se realiza esta investigación, surge a partir de artículos previos realizados por investigadores de EPINUT, en los que se mostró que el uso de dosis de sAF por encima de la recomendada durante el embarazo, se asociaba a bajo peso al nacimiento, a retraso psicomotor al año de edad y a déficits verbales a los cinco años de edad. Por otro lado, la literatura científica existente al respecto, aunque escasa, apoya los efectos perjudiciales del uso de dosis altas de sAF durante el embarazo en la función cognitiva de los hijos/as, así como también, del uso de dosis de sAF por debajo de la recomendada. En el contexto de estos hallazgos, y de las diferencias biológicas durante el desarrollo embrionario entre niños y niñas, nos preguntamos ¿las dosis por encima y por debajo de la dosis recomendada de sAF durante el embarazo son perjudiciales y afectan de forma distinta al desarrollo cognitivo de niños y niñas a los 4 y 9 años de edad?

Buscando respuestas a esta pregunta de investigación, conformamos esta tesis doctoral con dos artículos, siguiendo el formato de tesis doctoral por compendio de artículos y la normativa aprobada por la UMH para optar al grado de Doctor en el programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas. La presente tesis se organiza en: i) Introducción, en la que describiremos la relación entre los sAF durante el embarazo y la función cognitiva de los hijos/as; ii) Metodología, en la que indicaremos de forma global el diseño, población, variables y análisis estadístico de los artículos publicados; iii) Resultados, en los que expondremos los resultados principales de los artículos publicados, pudiendo consultarlos de forma más detallada en los propios artículos anexados al final de la tesis; iv) Discusión, en la que justificaremos, compararemos y trataremos de darle explicación a los resultados obtenidos en la presente tesis; v), Conclusiones; y vi) Implicaciones en Salud Pública, en las

que además incluiremos los aspectos que hacen novedosos los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral y cuáles serán los siguientes pasos de esta línea investigación.

Los artículos publicados e incluidos en esta tesis doctoral son:

1. **The Use of Lower or Higher Than Recommended Doses of Folic Acid Supplements during Pregnancy Is Associated with Child Attentional Dysfunction at 4–5 Years of Age in the INMA Project.**

Compañ Gabucio LM, García de la Hera M, Torres Collado L, Fernández-Somoano A, Tardón A, Guxens M, Vrijheid M, Rebagliato M, Murcia M, Ibarluzea J, Martí I, Vioque J. *Nutrients*. 2021; 13(2):327. <https://doi.org/10.3390/nu13020327>

**Factor de impacto:** 6.706

2. **Association between the Use of Folic Acid Supplements during Pregnancy and Children’s Cognitive Function at 7–9 Years of Age in the INMA Cohort Study.**

Compañ-Gabucio LM, Torres-Collado L, Garcia-de la Hera M, Fernández-Somoano A, Tardón A, Julvez J, Sunyer J, Rebagliato M, Murcia M, Ibarluzea J, Santa-Marina L, Vioque J.

*International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022; 19(19):12123.

<https://doi.org/10.3390/ijerph191912123>

**Factor de impacto:** 4.614



# ÍNDICE

---

	Página
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>12-13</b>
<b>Lista de figuras y tablas</b>	<b>14</b>
<b>Resumen</b>	<b>15-17</b>
<b>Abstract</b>	<b>18-20</b>
<b>Introducción</b>	<b>21-38</b>
<i>Folato y Ácido Fólico</i>	21-24
<i>Dieta materna y embarazo</i>	24-26
<i>Dosis recomendadas de suplementos de ácido fólico durante el embarazo</i>	27-29
<i>Dosis altas y bajas de suplementos de ácido fólico durante el embarazo</i>	29-30
<i>Papel del ácido fólico en el desarrollo temprano del cerebro</i>	31-33
<i>Función cognitiva</i>	33-38
<b>Justificación</b>	<b>39-40</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>41</b>
<b>Objetivos</b>	<b>41</b>
<b>Metodología</b>	<b>42-55</b>
<i>Diseño de estudio</i>	42
<i>Población de estudio</i>	43-45
<i>Variables de estudio</i>	46-52
Uso de suplementos de ácido fólico	46-47
Función cognitiva	47-51
Otras variables	52
<i>Análisis estadístico</i>	52-55
Análisis descriptivo	52
Análisis multivariante	52-54
Análisis de sensibilidad	55
<b>Resultados</b>	<b>56-59</b>
<b>Discusión</b>	<b>60-66</b>
<i>Período periconcepcional</i>	61-62
<i>Segundo período de embarazo</i>	62-63
<i>Diferencias entre niños y niñas</i>	63-65
<i>Limitaciones y fortalezas</i>	65-66
<b>Conclusiones</b>	<b>67</b>
<b>Implicaciones en Salud Pública</b>	<b>68-69</b>
<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>70-94</b>
<b>Anexos</b>	<b>95-136</b>
<b>Anexo 1.</b> Cuestionario de Frecuencia de Alimentos validado en madres embarazadas del estudio INMA.	96-100
<b>Anexo 2.</b> Primer artículo incluido en esta tesis doctoral.	101-118
<b>Anexo 3.</b> Segundo artículo incluido en esta tesis doctoral.	119-139
<b>Agradecimientos</b>	<b>140-142</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

5-MTHF; 5-metil-tetrahidrofolato

β; Beta

μg; microgramos

ADN; Ácido Desoxirribonucleico

AF; Ácido Fólico

ALSPAC; *Avon Longitudinal Study of Parents and Children* (Proyecto investigación)

ANT; *Attentional Network Test*

ARN; Ácido ribonucleico

BSID; Escalas Bayley de Desarrollo Infantil

C<sub>1</sub>; Carbono uno

CDC; Centros para el Control y Prevención de Enfermedades

CFA; Cuestionario de Frecuencia de Alimentos

CPF; Corteza prefrontal

d'; De prima, precisión.

DTN; Defectos del Tubo Neural

ELFE; *Étude Longitudinale Française depuis l'Enfance* (Proyecto investigación)

EPIC; *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (Proyecto investigación)

FASSTT; *Folic Acid Supplementation in the Second and Third Trimesters* (Proyecto investigación)

HOME; *Health Outcomes and Measures of the Environment* (Proyecto investigación)

HRT; Tiempo de respuesta

HRT-SE; Error estándar del tiempo de respuesta

IC; Intervalo de Confianza

IMC; Índice de Masa Corporal

INMA; Infancia y Medio Ambiente (Proyecto de investigación)

IRR; Ratios de tasas de incidencia

KCP-T; Conners' Kiddie Continuous Performance Test

m<sup>3</sup>; Metros cúbicos

M de Huber; un estimador basado en el concepto de máxima verosimilitud

mg; miligramos

MM; Estimador minimizador del estimador M de Huber

ms; Milisegundos

MSCA; Escalas McCarthy de Habilidades Infantiles

n; número

NHANES; *National Health and Nutrition Examination Survey* (Proyecto de investigación)

NO<sub>2</sub>; Dióxido de Nitrógeno

OECD; Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

OMS; Organización Mundial de la Salud

sAF; Suplementos de Ácido Fólico

TDAH; Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad

TEA; Trastorno del Espectro Autista



## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

---

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Principales grupos de alimentos que aportan folato en población general de Estados Unidos.	21
<b>Figura 2.</b> Principales grupos de alimentos que aportan folato en población general de Europa.	22
<b>Figura 3.</b> Estructuras químicas del Ácido Fólico y del Folato.	24
<b>Figura 4.</b> Países con legislación obligatoria sobre fortificación.	28
<b>Figura 5.</b> Metabolismo de C <sub>1</sub> .	32
<b>Figura 6.</b> Marco teórico neurodesarrollo.	34
<b>Figura 7.</b> Lóbulos cerebrales.	35
<b>Figura 8.</b> Lóbulos frontales.	36
<b>Figura 9.</b> Maduración de los lóbulos cerebrales desde la concepción hasta la edad adulta.	38
<b>Figura 10.</b> Localización geográfica de las siete cohortes que conforman el Proyecto INMA.	42
<b>Figura 11.</b> Visitas de seguimiento del proyecto INMA.	44
<b>Figura 12.</b> Flujo de participantes de los dos estudios que componen esta tesis doctoral.	45
<b>Figura 13.</b> Recogida de información dietética mediante cuestionario de frecuencia de alimentos.	47
<b>Figura 14.</b> Imagen de los peces que aparecen en el test ANT.	49
<b>Figura 15.</b> Ejemplificación N-Back Task; nivel 3-back.	50
<b>Figura 16.</b> Resumen gráfico de los resultados principales.	59
<b>Tabla 1.</b> Principales fuentes de ingesta de folato en diferentes países de Europa.	23
<b>Tabla 2.</b> Variables cognitivas exploradas en cada artículo y su batería de medición.	51
<b>Tabla 3.</b> Modelos de regresión usados con cada variable.	54

# RESUMEN

---

## Antecedentes

El uso de suplementos de ácido fólico (sAF) durante el embarazo está extendido globalmente desde que en 1991 el *Vitamin Study Research Group* publicara un ensayo clínico en el que se evidenciaba el papel protector de los sAF frente a los defectos del tubo neural al nacimiento. Desde entonces, instituciones de todo el mundo recomiendan, por tanto, usar dosis diarias de 400 µg/día durante el período periconcepcional de embarazo, esto es, desde tres meses antes del embarazo, hasta el tercer mes de embarazo; así como tratar de no superar el límite máximo tolerable de 1000 µg/día; y seguir una dieta variada y rica en folato. El ácido fólico, además, es una vitamina esencial para el correcto neurodesarrollo fetal, pues juega un importante papel en procesos fisiológicos que intervienen en el desarrollo de la estructura y función cerebral como son la síntesis, reparación y metilación del ADN, el metabolismo de aminoácidos, la síntesis de neurotransmisores y la formación de mielina.

Algunos estudios han mostrado que las altas dosis de sAF podrían quedar circulantes en el organismo sin metabolizarse conllevando posibles efectos adversos para la salud, a pesar de que el ácido fólico se considera una vitamina segura y libre de toxicidad para el organismo. En esta línea, estudios previos enmarcados en el proyecto Infancia y Medio Ambiente (INMA) han mostrado que las dosis de sAF superiores o iguales a 1000 µg/día durante el embarazo se asocian con retraso psicomotor durante el primer año de vida y déficits de la función verbal a los 5 años de edad. Por otra parte, hay estudios que han mostrado que las dosis de sAF por debajo de la recomendada (<400 µg/día), también parecen tener efectos negativos en el desarrollo cognitivo de los hijos/as, tales como un menor volumen cerebral, déficits verbales y peor destreza viso-espacial a los 6 años de edad.

A pesar de que la evidencia científica sobre el efecto del uso de sAF durante el embarazo en el desarrollo cognitivo de los hijos/as es muy escasa, hay estudios que sugieren que el efecto podría ser distinto en niños y niñas. Un estudio publicado en 2021 ha mostrado que el uso de dosis recomendadas de sAF en comparación al no uso, parece incrementar la comprensión verbal de las niñas, pero no de los niños. Estas diferencias por sexo pueden estar parcialmente justificadas por las diferencias biológicas entre niños y niñas en el desarrollo embrionario, durante el cual los niños parecen tener una mayor conectividad neuronal que las niñas en el córtex frontal, área muy relacionada con las funciones cognitivas.

## Objetivo de la tesis

Analizar la asociación entre el uso de sAF durante el embarazo en dosis por encima o por debajo de la dosis recomendada y la función cognitiva en niños/as a los 4-5 años, y a los 7-9 años de edad, así como estratificados por sexo.

## Metodología

El proyecto INfancia y Medio Ambiente (Estudio INMA) es un estudio de cohorte de nacimiento, prospectivo y de base poblacional que se lleva a cabo en cuatro áreas geográficas españolas ([www.proyectoinma.org](http://www.proyectoinma.org)). La población de estudio fueron las madres-hijos/as participantes en el proyecto (n=1329 madres-hijos/as a los 4-5 años de edad y n=1609 madres-hijos/as a los 7-9 años de edad). Las variables principales en ambos artículos fueron el uso de sAF durante el embarazo y la función cognitiva de los hijos/as. El uso de sAF se recogió mediante preguntas específicas en dos cuestionarios de frecuencia de alimentos (CFA) validados en mujeres embarazadas. El primer CFA se recogió en las semanas 10-13 de embarazo, para estimar el uso de sAF durante el período periconcepcional (3 meses antes del embarazo hasta el tercer mes de embarazo), y el segundo en las semanas 28-32, para estimar el uso de sAF durante el segundo período de embarazo (meses 4-7 de embarazo). El uso de sAF se categorizó en <400 µg/día (dosis bajas), 400-999 µg/día (dosis recomendadas) y ≥1000 µg/día (dosis altas) para tres períodos de embarazo: periconcepcional, segundo período y embarazo entero (periconcepcional + segundo período). En cuanto a la función cognitiva, a los 4-5 años de edad, se evaluó la función atencional a través de la batería Conners' Kiddie Continuous Performance Test (K-CPT). A los 7-9 años de edad, se evaluó la función atencional mediante la batería Attentional Network Test (ANT) y la memoria de trabajo mediante la batería N-Back Task. El análisis estadístico de ambos artículos se llevó a cabo mediante el programa R-Project. Realizamos análisis descriptivos univariantes y bivariantes, usando chi-cuadrado para variables categóricas y Kruskal-Wallis para variables continuas. Para explorar las asociaciones entre el uso de sAF y la función atencional de los niños/as a los 4-5 años de edad, utilizamos regresión lineal múltiple robusta y regresión binomial negativa. Para los 7-9 años de edad, utilizamos regresión lineal múltiple robusta, regresión binomial negativa y regresión Tobit. Por último, realizamos metaanálisis y análisis de sensibilidad.

## Resultados

La mediana de edad de las madres en el parto fue de 31 años. Alrededor del 40% de las madres tenían estudios secundarios y baja clase social. Durante el período periconcepcional, aproximadamente el 15% de las madres usaron la dosis recomendada de sAF, el 30% dosis altas y el 55% dosis bajas. Durante el segundo período de embarazo, el porcentaje de madres que tomaron la dosis recomendada de sAF aumentó hasta aproximadamente el 30%, mientras que el uso de dosis altas se redujo hasta aproximadamente el 18% y el uso de dosis bajas se mantuvo cerca del 50%.

A los 4-5 años de edad, los hijos/as de las madres que se suplementaron durante el período periconcepcional de embarazo con dosis por debajo o por encima de la dosis recomendada, presentaron mayor inatención (IRR = 1.14; IC 95% = 1.01; 1.29 y IRR = 1.16; IC 95% = 1.02; 1.33, respectivamente) que los hijos/as de las madres que usaron dosis recomendadas de sAF. Este efecto perjudicial de las dosis periconcepcionales altas y bajas de sAF solo se mantuvo estadísticamente



significativo en los niños, tras estratificar por sexo los análisis. En ellos, el uso de dosis por debajo de la recomendada durante el período periconcepcional se asoció con mayor inatención (IRR = 1.22; IC 95% = 1.01; 1.47) y mayor impulsividad ( $\beta$  = 34.36; IC 95% = 10.01; 58.71). Mientras que el uso de dosis por encima de la recomendada se asoció con mayor impulsividad ( $\beta$  = 33.18; IC 95% = 6.10; 60.25) y peor atención sostenida ( $\beta$  = 3.31; IC 95% = 0.53; 6.09). Durante el segundo período de embarazo, encontramos una asociación protectora marginalmente significativa entre el uso bajo de sAF y la función atencional de las niñas (IRR = 0.86; IC 95% = 0.74; 1.00). No se encontraron otras asociaciones estadísticamente significativas en otros períodos de embarazo.

A los 7-9 años de edad, los hijos/as de las madres que se suplementaron durante el segundo período de embarazo con dosis por debajo de la dosis recomendada, presentaron peor estado de alerta ( $\beta$  = 18.70; IC 95% = 7.51; 29.89) que los hijos/as de las madres que usaron dosis recomendadas de sAF. Los resultados estratificados por sexo mostraron que el uso de dosis por debajo de la recomendada se asoció a peor estado de alerta en niñas ( $\beta$  = 30.01; IC 95% = 12.96; 47.01) y a peor memoria de trabajo en niños ( $\beta$  = -0.25; IC 95% = -0.49; 0.01). Finalmente, el uso de dosis por encima de la recomendada durante todo el embarazo se asoció a una mejor memoria de trabajo ( $\beta$  = 0.28; IC 95% = 0.01; 0.56 y  $\beta$  = 0.32; IC 95% = 0.08; 0.56) y a una mejor atención sostenida ( $\beta$  = -20.38, IC 95% = -39.12; -1.63) solo en niñas. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas en el período periconcepcional.

## Conclusiones

Usar la dosis recomendada de sAF tanto en el período periconcepcional, como en el segundo período de embarazo se asocia a una mejor función cognitiva de los/as niños/as, específicamente de la función atencional a los 4-5 años; y de la función atencional y memoria de trabajo a los 7-9 años. El uso de sAF por encima o por debajo de la dosis recomendada durante el embarazo parece afectar a la función cognitiva de niños y niñas de forma distinta, tanto a los 4-5 años de edad como a los 7-9 años. A los 4-5 años de edad, el uso periconcepcional de dosis altas y bajas de sAF podría producir inatención en los niños, pero no en las niñas. A los 7-9 años de edad, el uso de dosis bajas de sAF durante el segundo período de embarazo podría disminuir la memoria de trabajo de los niños y la función atencional de las niñas. Además, el uso de dosis altas durante todo el embarazo podría mejorar la memoria de trabajo y función atencional de las niñas. No obstante, son necesarios más estudios que confirmen estos resultados.

# ABSTRACT

---

## Background

Folic acid supplements (FAs) during pregnancy have been used worldwide since 1991, when the Vitamin Study Research Group published a clinical trial showing the protective role of FAs against neural tube defects at birth. Institutions around the world recommend that pregnant women take doses of 400 µg per day of FAs during the periconceptual period of pregnancy, i.e. from three months before pregnancy until the third month of pregnancy; avoid exceeding the tolerable upper limit of 1000 µg per day; and follow a varied diet rich in folate. Folic acid is an essential vitamin for correct foetal neurodevelopment, as it plays an important role in physiological processes involved in the development of brain structure and function, such as DNA synthesis, repair and methylation; amino acid metabolism; neurotransmitter synthesis; and myelin formation.

Folic acid has previously been considered a safe and non-toxic vitamin but some studies have shown that high doses of FAs can remain in the mother's bloodstream leading to possible adverse health effects in her offspring. In this line, previous studies within the framework of the INMA—INfancia y Medio Ambiente [Environment and Childhood] —Project have shown that doses of FAs greater than or equal to 1000 µg/day during pregnancy are associated with psychomotor delay at age 1 and verbal function deficits at age 5. Similarly, some studies have shown that FAs doses below the recommended 400 µg/day also appear to have negative effects on children's cognitive development, such as smaller brain volume, verbal deficits and poorer visuospatial skills at age 6.

Scientific evidence on the effect of FAs during pregnancy on children's cognitive development is very scarce. However, studies exist suggesting that the effect may be different in boys and girls. A study published in 2021 has shown that the use of recommended doses of FAs, compared to non-use, appears to increase verbal comprehension in girls, but not in boys. These sex-specific effects may be partially justified by biological differences between boys and girls during embryonic development, in which boys appear to have greater neural connectivity than girls in the frontal cortex, a brain area closely related to cognitive functions.

## Objectives

To analyse the association between the use of FAs during pregnancy at doses above or below the recommended dose and cognitive function in children at 4-5 years, and at 7-9 years, and stratified by sex.

## Methods

The INMA—Infancia y Medio Ambiente [Environment and Childhood] Project—is a population-based prospective birth cohort study carried out in four Spanish cohorts ([www.proyectoinma.org](http://www.proyectoinma.org)). Our study population was the mother-children participating in the project (n=1329 mother-children at 4-5 years and n=1609 mother-children at 7-9 years). The main variables in both articles were the use of FAs during pregnancy and the children's cognitive function. FAs use was collected through specific questions of two validated food frequency questionnaires (FFQ). The first FFQ was administered at weeks 10-13 of pregnancy weeks to estimate FAs intake during the periconceptual period (from three months preconception to the third month of pregnancy), and the second was administered at weeks 28-32 to estimate FAs intake during the second period of pregnancy (from the fourth to the seventh month of pregnancy). FAs use was categorised into <400 µg/day (low doses), 400-999 µg/day (recommended doses) and ≥1000 µg/day (high doses) in the three studied periods: periconceptual period, second period and whole pregnancy (periconceptual + second period). At 4-5 years cognitive function was measured as attentional function which was assessed using the Conners' Kiddie Continuous Performance Test (K-CPT), while at 7-9 years, cognitive function was measured as attentional function and working memory, which were assessed by the Attentional Network Test (ANT) and the N-Back Task, respectively. The statistical analysis was carried out using R-Project software. We performed univariate and bivariate descriptive analyses, using chi-square for categorical variables and Kruskal-Wallis for continuous variables. To explore the association between FAs and children's attentional function at age 4-5, we used robust multiple linear regression and negative binomial regression models. While at age 7-9, we used robust multiple linear regression, negative binomial regression and Tobit regression. Finally, we conducted meta-analyses and sensitivity analyses.

## Results

The median age of mothers at delivery was 31 years. About 40% of the mothers had secondary education and low social class. During the periconceptual period, about 15% of the mothers used the recommended dose of FAs, 30% high doses and 55% low doses. During the second period of pregnancy, the percentage of mothers taking the recommended dose of FAs increased to approximately 30%, while the use of high doses decreased to approximately 18%, and the use of low doses remained at about 50%.

At age 4-5, children of mothers who used below or above the recommended FAs dose during the periconceptual period of pregnancy were more inattentive (IRR = 1.14; 95% CI = 1.01;1.29 and IRR = 1.16; 95% CI = 1.02; 1.33, respectively) than children of mothers who used the recommended FAs doses. When we stratified the analyses by sex, the detrimental effect of high and low doses of FAs on attentional function only remained in boys. Specifically, in the case of boys, the use of FAs below the recommended doses was associated with greater inattention (IRR = 1.22; 95% CI = 1.01; 1.47) and higher impulsivity ( $\beta = 34.36$ ; 95% CI = 10.01; 58.71), while the use of FAs above the recommended

doses was associated with higher impulsivity ( $\beta = 33.18$ ; 95% CI = 6.10; 60.25) and worse sustained attention ( $\beta = 3.31$ ; 95% CI = 0.53; 6.09). During the second period of pregnancy, we found a marginally significant protective association between a low FAs use and attentional function in girls (IRR = 0.86; 95% CI = 0.74; 1.00). No other statistically significant associations were found in other periods of pregnancy.

At 7-9 years, children of mothers who used FAs doses below the recommended doses during the second period of pregnancy had worse alertness ( $\beta = 18.70$ ; 95% CI = 7.51; 29.89) than children of mothers who used recommended doses of FAs. Results stratified by sex showed that the use of FAs below the recommended doses was associated with worse alertness ( $\beta = 30.01$ ; 95% CI = 12.96; 47.01) in girls and worse working memory in boys ( $\beta = -0.25$ ; 95% CI = -0.49; 0.01). Finally, the use of FAs above the recommended doses throughout pregnancy was only associated with better working memory ( $\beta = 0.28$ , 95% CI = 0.01, 0.56 and  $\beta = 0.32$ , 95% CI = 0.08, 0.56) and better sustained attention ( $\beta = -20.38$ , 95% CI = -39.12, -1.63) in girls. No statistically significant associations were found in the periconceptual period.

## Conclusions

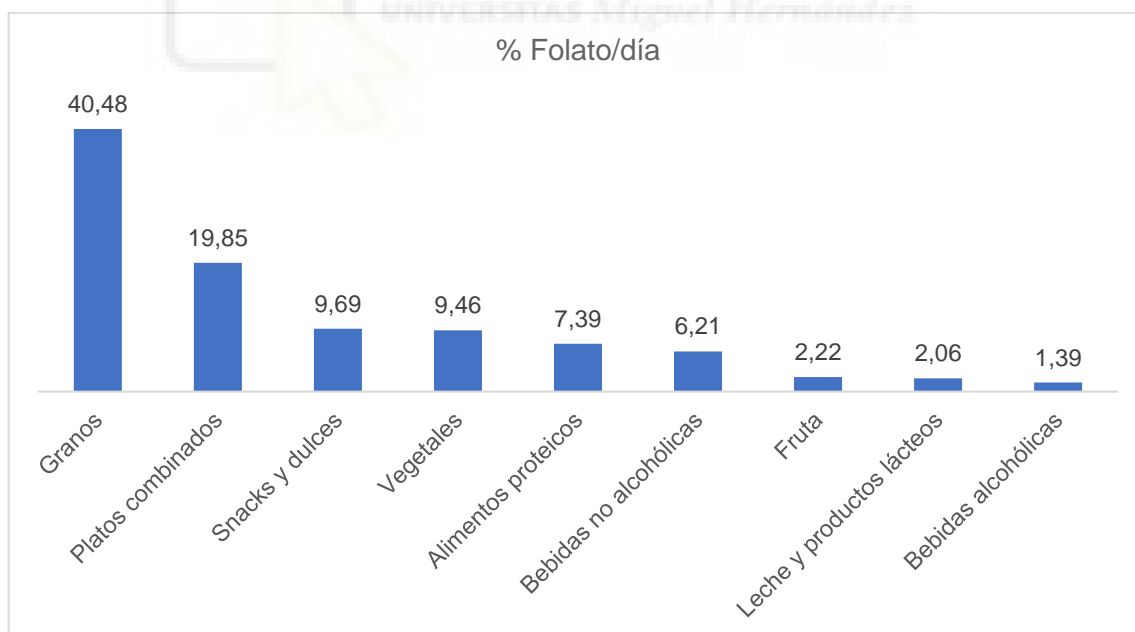
The use of recommended doses of FAs both in the periconceptual period and in the second period of pregnancy is associated with improved children's cognitive function, specifically attentional function at age 4-5; and attentional function and working memory at age 7-9. The use of high and low doses of FAs during pregnancy could affect the cognitive function of boys and girls differently, both at 4-5 years and at 7-9 years. At age 4-5, periconceptual use of high and low doses of FA appears to produce inattention in boys, but not in girls. At age 7-9, low doses of FAs during the second period of pregnancy could decrease boys' working memory and girls' attentional function. In addition, the use of high doses of FAs throughout pregnancy seems to improve girls' working memory and attentional function. Further studies are needed to confirm these results.

# INTRODUCCIÓN

## FOLATO Y ÁCIDO FÓLICO

El folato es un micronutriente esencial dentro del complejo B de vitaminas (vitamina B9) que actúa como cofactor en numerosos procesos biológicos de nuestro organismo, especialmente relacionados con el desarrollo del sistema nervioso central, como la metilación de ADN (Shulpekova et al., 2021). Se trata de una vitamina hidrosoluble, que se encuentra de forma natural en vegetales de hoja verde, como espinacas, rúcula, brócoli, berros, lechuga, col o acelgas, así como en lentejas, guisantes y huevos (Haytowitz & Pehrsson, 2018). Los humanos no somos capaces de sintetizar folato, por lo que es necesario procurar una ingesta adecuada a través de la dieta (Yaman et al., 2021). Las principales fuentes de ingesta de folato varían entre países. Por ejemplo, en Estado Unidos, la encuesta poblacional *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) (Papanikolaou & Fulgoni, 2018) ha indicado que la principal fuente de ingesta de folato son los granos-cereales como grupo de alimentos, proporcionado el 40% de la ingesta diaria (Figura 1), siendo los cereales listos para tomar los responsables de la mayor aportación, pues suelen estar fortificados con ácido fólico (21% de la ingesta diaria de folato).

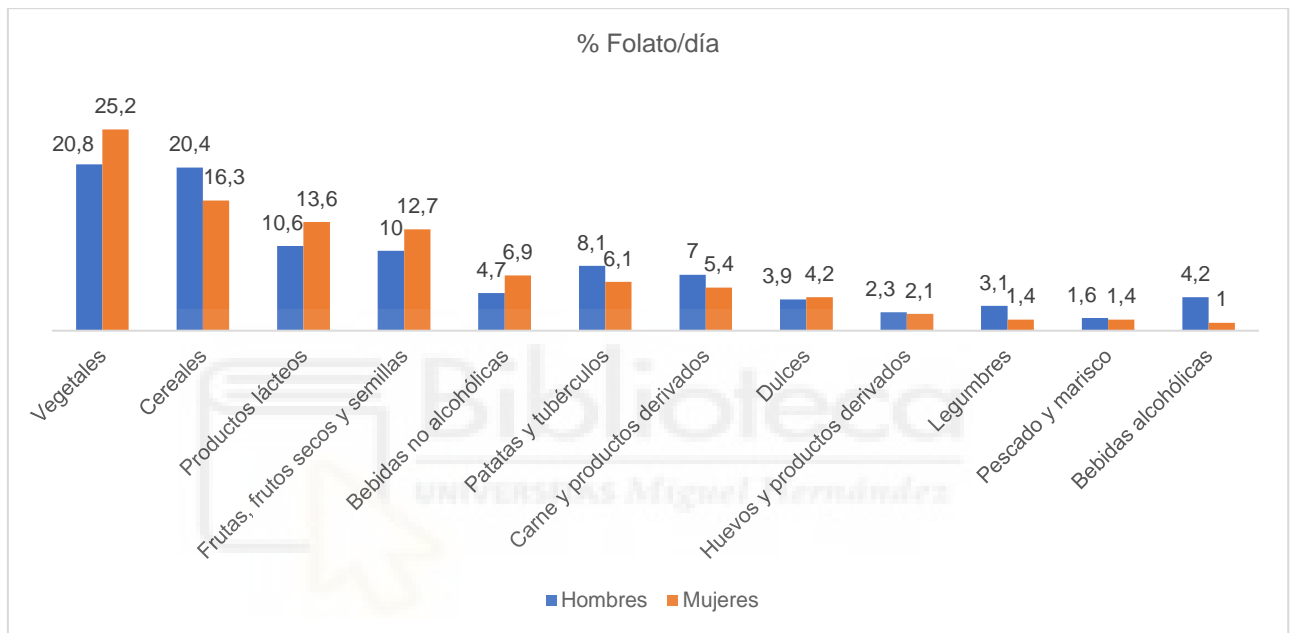
**Figura 1.** Principales grupos de alimentos que aportan folato en población general de Estados Unidos.



**Fuente:** Elaboración propia a partir de Grains Contribute Shortfall Nutrients and Nutrient Density to Older US Adults: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2011–2014 (Papanikolaou & Fulgoni, 2018).

Por el contrario, en Europa (Park et al., 2012), los principales aportadores de folato son los vegetales, según datos publicados por el estudio de cohorte *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC) (Figura 2). En España los vegetales son también la principal fuente de ingesta de folato, y destaca que es el país europeo del estudio EPIC que más porcentaje de folato ingiere a través de las legumbres, frutas/frutos secos/semillas y pescados/mariscos, así como el que menos porcentaje de folato ingiere a través de los cereales (Tabla 1).

**Figura 2.** Principales grupos de alimentos que aportan folato en población general de Europa.



**Fuente:** Elaboración propia a partir de Comparison of standardised dietary folate intake across ten countries participating in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (Park et al., 2012).

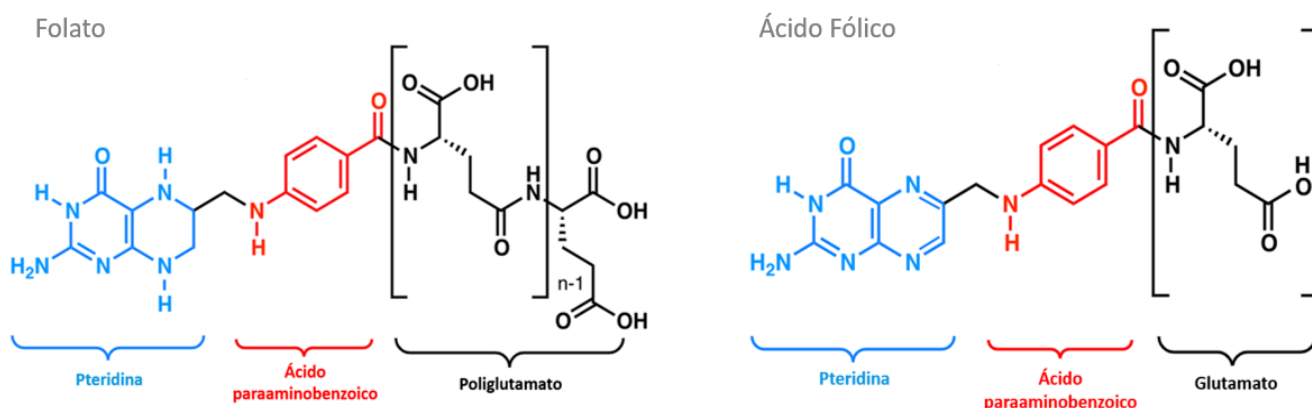
**Tabla 1.** Principales fuentes de ingesta de folato en diferentes países de Europa.

Country	Dietary food groups (percentage contribution of each food group to total intake of the nutrient)												Total
	Potatoes/ other tubers	Vegetables	Legumes	Fruits, nuts and seeds	Dairy products	Cereal and cereal products	Meat and meat products	Fish/ shellfish	Egg and egg products	Sugar, confectionery/ cakes, biscuits	Non alcoholic beverages	Alcoholic beverages	
<b>Men</b>													
All men	8.1	20.8	3.1	10.0	10.6	20.4	7.0	1.6	2.3	3.9	4.7	4.2	96.6
Greece	4.5	29.7	6.8	9.9	8.5	27.7	2.9	1.6	1.5	1.2	2.3	1.5	98.0
Spain	6.3	24.6	11.4	14.0	6.4	12.6	6.7	3.3	4.3	2.2	2.2	1.9	96.0
Italy	4.0	30.0	1.8	12.4	6.1	24.9	7.4	1.2	1.5	3.9	1.7	1.4	96.2
Germany	8.0	19.3	0.4	10.7	10.7	20.1	6.1	0.7	1.8	4.0	7.1	7.7	96.5
The Netherlands	8.4	19.2	0.4	9.9	13.1	16.4	10.7	0.7	2.0	2.3	7.0	6.3	96.5
United Kingdom	7.8	17.8	2.7	7.8	8.2	26.3	2.7	0.8	1.2	3.4	9.9	3.0	91.6
General population	8.5	17.4	2.0	6.0	9.8	27.2	3.4	1.0	1.4	3.7	10.7	3.4	94.6
Health conscious	5.9	18.8	4.6	12.7	3.9	24.0	0.8	0.1	0.6	2.4	7.9	1.8	83.6
Denmark	8.2	14.8	0.2	6.5	15.9	21.1	11.6	1.7	2.3	4.5	5.4	6.1	98.4
Sweden	14.4	14.5	0.6	8.0	13.4	19.4	5.8	1.6	2.5	7.5	4.9	3.9	96.5
<b>Women</b>													
All women	6.1	25.2	1.4	12.7	13.6	16.3	5.4	1.4	2.1	4.2	6.9	1.0	96.3
Greece	4.2	33.6	5.0	11.2	10.3	22.9	2.1	1.4	1.6	2.0	3.9	0.5	98.5
Spain	5.8	27.0	6.9	18.3	9.7	9.9	4.9	2.7	3.4	3.2	3.3	0.8	95.9
Italy	3.2	32.0	2.0	15.6	8.1	20.1	5.1	1.0	1.8	4.8	2.4	0.5	96.6
France	4.6	28.5	1.0	12.8	16.4	12.6	6.2	1.5	1.8	3.3	5.8	0.6	95.1
Germany	6.7	25.6	0.2	13.4	12.8	16.9	3.8	0.6	1.8	4.1	8.9	1.7	96.9
The Netherlands	6.9	21.6	0.4	12.4	16.5	13.1	7.4	0.6	2.1	2.9	12.0	0.9	96.7
United Kingdom	6.4	22.4	2.6	9.7	9.3	22.7	2.2	0.9	1.2	3.5	11.0	0.6	92.6
General population	6.9	21.1	2.0	8.7	10.9	24.6	3.0	1.0	1.5	3.6	11.7	0.6	95.6
Health conscious	5.4	25.3	3.9	12.2	5.7	18.5	0.4	0.5	0.7	3.3	9.4	0.5	85.8
Denmark	6.2	19.9	0.2	10.7	15.9	20.8	6.3	1.5	2.3	4.8	7.5	2.1	98.3
Sweden	10.5	19.7	0.4	11.4	13.7	16.2	4.9	1.6	2.6	7.7	5.9	1.6	96.2
Norway	6.8	20.3	0.2	10.9	12.5	19.4	6.0	2.2	2.6	5.6	9.8	1.2	97.5

**Fuente:** Comparison of standardised dietary folate intake across ten countries participating in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (Park et al., 2012).

En situaciones específicas, como el embarazo o ciertas enfermedades, es necesario asegurar la asimilación de folato a través del aporte de su forma sintética, el ácido fólico (Figura 3). Este suplemento es mucho más fácil de asimilar por nuestro organismo (Cuskelly et al., 1996; Greenberg et al., 2011), llegando a absorberse el 100% con el estómago vacío y cerca del 85% junto a la toma de alimentos, mientras que de folato absorbemos alrededor del 50% (Caudill, 2010; Shane, 2008). La dieta suele ser suficiente para cubrir las necesidades de folato de la población general, sin embargo, en mujeres embarazadas los requerimientos de este micronutriente son entre 5-10 veces mayores, por lo que es necesario el uso de sAF que aseguren la ingesta óptima (Naninck et al., 2019). Tener el aporte necesario de ácido fólico y las concentraciones adecuadas en sangre durante el embarazo es esencial para favorecer el crecimiento óptimo de los tejidos maternos y fetales (Scholl & Johnson, 2000; Tamura & Picciano, 2006), gracias a que así se mantiene el transporte activo de folato madre-hijo a través de la placenta (Desai et al., 2016).

**Figura 3.** Estructuras químicas del Ácido Fólico y del Folato.



**Fuente:** Modificado de Boghog, CC BY-SA 4.0 < [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Folate\\_family.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Folate_family.svg) >, via Wikimedia Commons y contrastado con Folatos y vitamina B12 en la salud humana (Brito et al., 2012).

## DIETA MATERNA Y EMBARAZO

El embarazo es una etapa marcada por diferentes procesos de crecimiento y desarrollo, en la cual las mujeres sufren una serie de cambios fisiológicos, metabólicos y hormonales, que favorecen el correcto desarrollo del feto y ayudan a preparar a la madre para el parto y la lactancia (Abduljalil et al., 2012; Soma-Pillay et al., 2016). Durante esta etapa, las necesidades nutricionales cambian, siendo considerablemente diferentes a las de las mujeres no embarazadas, requiriendo un mayor aporte energético y de nutrientes para dar respuesta al rápido crecimiento de tejido celular de la madre y del feto (Jouanne et al., 2021). Las mujeres embarazadas necesitan, por tanto, una dieta saludable que incluya una ingesta adecuada de energía, proteínas, vitaminas y minerales para satisfacer tanto las necesidades maternas como las fetales (*WHO Antenatal Care Recommendations for a Positive Pregnancy Experience*, 2020).

Una nutrición adecuada durante el embarazo es vital para la buena salud de la madre, así como para favorecer el crecimiento y el desarrollo del feto a lo largo del embarazo y tras el mismo (Blumfield et al., 2013; Milman et al., 2016; Procter & Campbell, 2014). Los desequilibrios en la dieta materna, como la ingesta escasa de nutrientes, pueden tener efectos adversos a corto plazo durante el embarazo y en la descendencia, como bajo peso al nacimiento, crecimiento fetal deficiente y malformaciones fetales (Brown & Wright, 2020; Yang et al., 2019). Así como a largo plazo, ya que un mal estado nutricional de la madre durante el embarazo puede aumentar sustancialmente el riesgo de que la descendencia desarrolle enfermedades crónicas en el futuro, tales como la obesidad, la diabetes o las cardiopatías



(Osendarp et al., 2020; Wells et al., 2020). En consecuencia, la dieta materna, junto a otros factores ambientales y de estilos de vida, podrían tener un impacto significativo en el desarrollo fetal, estableciendo incluso vías de enfermedad en la edad adulta (Barker, 2007; Breton et al., 2017).

La dieta materna durante el embarazo y sus efectos en la salud de la descendencia durante y tras el embarazo ha sido, y continúa siendo, estudiada por diferentes consorcios, proyectos y estudios. En Estados Unidos destaca el proyecto Viva, una cohorte prospectiva de nacimiento establecida en Massachusetts con el objetivo de examinar la dieta prenatal y otros factores en relación con la salud materna e infantil (Oken et al., 2015). En 2022, esta cohorte publicó un estudio en el que se evaluó tanto la adherencia a la Dieta Mediterránea como la calidad de la dieta de la madre durante el embarazo y su relación con la función cognitiva de los niños/as en distintos momentos de la infancia (Mahmassani et al., 2022). Los resultados mostraron que una adherencia más alta a la Dieta Mediterránea durante el embarazo se asocia a una mayor inteligencia y resolución de problemas en niños/as a los 7 años; y que una calidad de la dieta más alta se asocia a mayores capacidades visoespaciales, inteligencia y función ejecutiva a los 3 años (Mahmassani et al., 2022). En 2018, también mostraron que un mayor consumo de alimentos considerados poco saludables durante el embarazo, como el consumo de azúcar, parecía tener un impacto negativo en la función cognitiva de los niños/as en la infancia. En concreto, mostraron que la ingesta materna alta de azúcar se asoció a una menor inteligencia de los niños/as a los 7 años, y más específicamente, el consumo materno de bebidas azucaradas se asoció a una menor inteligencia a los 7 años y el consumo materno de bebidas gaseosas se asoció a una menor inteligencia a los 3 y a los 7 años (Cohen et al., 2018).

En Reino Unido, destaca el estudio *Avon Longitudinal Study of Parents and Children* (ALSPAC) por ser una de las cohortes de nacimiento prospectivas con más años de seguimiento, actualmente, se encuentran realizando el seguimiento de la descendencia a los 30 años de edad (Boyd et al., 2013). Esto ha posibilitado que cuenten con una de las bases de datos en salud madre-hijo/a más grandes a nivel mundial y hayan podido estudiar diversas influencias en la salud y el desarrollo de los participantes a lo largo de la vida. En relación a la dieta materna durante el embarazo y sus efectos en la salud de la descendencia, publicaron un artículo en 2017 en el que categorizaron a las madres usando análisis cluster según sus hábitos dietéticos durante el embarazo, asignando a las madres en los siguientes grupos cluster: frutas y verduras; carne y patatas; pan blanco y café. Los resultados mostraron que las mujeres embarazadas clasificadas en el grupo de frutas y verduras tuvieron hijos/as con un cociente intelectual medio superior a los 8 años que los hijos/as de las madres del grupo de carne y patatas y del grupo de pan blanco y café (Freitas-Vilela et al., 2018).

En Europa, el consorcio *ALPHABET* tiene por objetivo examinar la interacción entre la calidad de la dieta materna, la epigenética y la salud de la descendencia (L.-W. Chen et al., 2021). Este consorcio ha publicado un estudio recientemente, que incluía siete cohortes de embarazadas de cinco países europeos, en el que han mostrado que una mejor calidad de la dieta durante el embarazo se asocia a un mayor peso del bebé al nacimiento y a un menor riesgo de ser pequeño para la edad gestacional al nacimiento (L.-W. Chen et al., 2021). Otra cohorte europea es el estudio de cohorte de nacimiento *Étude Longitudinale Française depuis l'Enfance* (ELFE) (de Lauzon-Guillain et al., 2022) que tiene por

objetivo examinar cómo el entorno de los niños/as desde su nacimiento afecta a su desarrollo, salud y socialización desde el período intrauterino hasta la adolescencia. En relación a la dieta materna durante el embarazo, han publicado un estudio reciente en el que muestran como un mayor consumo de nutrientes, especialmente de los procedentes de frutas y verduras, durante el embarazo se asocia a un mejor desarrollo cognitivo de la descendencia al año de edad (de Lauzon-Guillain et al., 2022). Por último, destacan también los resultados obtenidos por el estudio Generation R (Kooijman et al., 2016, p. 20) un estudio de cohortes prospectivo poblacional de los Países Bajos, cuyo objetivo es identificar las causas ambientales y genéticas tempranas y las vías causales que conducen al crecimiento, desarrollo y salud normales y anormales desde la vida fetal, la infancia y la edad adulta temprana. Entre sus resultados, han mostrado como la baja adherencia a una Dieta Mediterránea al principio del embarazo (< 18 semanas) parece asociarse a una reducción del tamaño intrauterino, con una placenta más baja y un menor peso al nacimiento (Timmermans et al., 2012).

En España, el proyecto Infancia y Medio Ambiente (INMA) tiene por objetivo evaluar el efecto de contaminantes medioambientales y la dieta en embarazadas y sus hijos/as (Guxens et al., 2012). En el marco de este estudio de cohorte, se ha evidenciado como una mayor adherencia a la dieta mediterránea de la madre durante el embarazo se asocia a un menor riesgo de alteraciones del crecimiento de la descendencia al nacimiento (Fernández-Barrés et al., 2019) y un menor riesgo de obesidad abdominal a los 4 años de edad (Fernández-Barrés et al., 2016). En relación a ciertos alimentos en particular, se ha publicado un estudio muy reciente en el que se muestra que un mayor consumo de alimentos considerados poco saludables durante el embarazo, como los ultraprocesados, se asocia a una menor fluencia verbal en la infancia temprana (Puig-Vallverdú et al., 2022). Por el contrario, se ha mostrado que un mayor consumo de alimentos considerados saludables durante el embarazo, como el pescado y marisco, se asocia a una mejor función atencional de los hijos/as a los 8 años de edad (Julvez et al., 2020).

La dieta materna desempeña un papel crucial en el estado nutricional antes y durante el embarazo (Cheatham, 2019; Cusick & Georgieff, 2016; Stephenson et al., 2018). El estado nutricional de la madre, junto con las variables parentales, ambientales, genéticas y socioeconómicas, influyen en el desarrollo del cerebro infantil y en las funciones neurocognitivas de la descendencia en diferentes etapas de la vida (Barrero-Castillero et al., 2019; Schwarzenberg et al., 2018). Sin embargo, el desarrollo cerebral y cognitivo es un proceso multifactorial y complejo, sobre el cual todavía debe realizarse más investigación para identificar los efectos clave de la dieta antes y durante el embarazo, ya que podrían ser la base para mejorar la salud y el desarrollo de los bebés (Belfort et al., 2016; Cormack et al., 2019). En este sentido, se está prestando cada vez más atención al papel de los suplementos nutricionales durante el embarazo, destacando los sAF por su implicación en diversos procesos fisiológicos durante el desarrollo embrionario y fetal.

## DOSIS RECOMENDADAS DE sAF DURANTE EL EMBARAZO

El uso de sAF durante el embarazo está extendido a nivel mundial desde que en 1991 fuera recomendado por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control (CDC), 1991). Esta recomendación se produjo tras la publicación de varios estudios observacionales iniciales en los que se sugería un efecto protector del uso de sAF durante el embarazo sobre la recurrencia de defectos del tubo neural (DTN) al nacimiento (Gatenby & Lillie, 1960; Nevin & Seller, 1990; Smithells et al., 1980, 1989). A partir de estos estudios se realizó el estudio de intervención auspiciado por el *Medical Research Council* británico («Prevention of Neural Tube Defects», 1991). Este fue un ensayo clínico aleatorizado realizado con unas 1200 embarazadas con antecedentes de hijos/as con DTN reclutadas en 33 centros de siete países diferentes. En este estudio, se usaron dosis altas de sAF (4 mg/día) dada la población de DTN previos y se observó que se prevenía en un 70% la recurrencia de hijos/as con DTN al nacimiento entre las madres que tomaron sAF. Esta es la razón de que, en primera instancia, la recomendación fuera dirigida específicamente a madres con antecedentes de hijos/as con DTN. No obstante, esto cambió en el año 1992 debido a los resultados de un ensayo clínico aleatorizado realizado en Hungría, que mostraban que el uso de sAF durante el período periconcepcional (desde 3 meses antes del embarazo hasta el tercer mes de embarazo) reducía significativamente el riesgo de tener por primera vez hijos/as con DTN al nacimiento (Czeizel & Dudás, 1992).

En 1996, se iniciaron además procesos de fortificación de alimentos con sAF en algunos países como Estados Unidos, con el fin de complementar las recomendaciones sobre el uso de sAF, asegurar los niveles de folato en sangre óptimos a nivel poblacional, y especialmente entre las mujeres susceptibles, y prevenir así los DTN al nacimiento (US Food and Drug Administration, 1996). En 1998, un panel de expertos pertenecientes al Instituto de Medicina de Estados Unidos (Institute of Medicine (US), 1998) evaluó y publicó una guía de referencia de consumo diario de distintas vitaminas, entre ellas el ácido fólico, indicando sus rangos recomendados de consumo. La dosis diaria recomendada de sAF en mujeres embarazadas se mantuvo en 400 µg/día, en base a los resultados de una revisión de la literatura de los ensayos clínicos y casos clínicos publicados hasta esa fecha. De forma novedosa, en esta guía se publicó el límite máximo tolerable de consumo de ácido fólico, siendo éste de 1000 µg/día en población adulta, incluyendo a las mujeres embarazadas. Esto sucede tras realizar la revisión de la literatura y observar evidencia de ciertos efectos perjudiciales neurológicos derivados del consumo de altas dosis de ácido fólico (más de 1000 µg/día) en población adulta con síndrome de deficiencia de vitamina B12 (Schwartz et al., 1950; Will et al., 1959). Esta es una deficiencia que afecta a gran parte de la población adulta y pasa desapercibida hasta que se combina con altas dosis de ácido fólico, procedentes de suplementos vitamínicos y/o alimentos fortificados, que inicia un declive neurológico irreversible (Institute of Medicine (US), 1998). Por ello, a pesar de no evidenciarse hasta ese entonces efectos perjudiciales del uso alto de sAF en embarazadas o población general, se estableció el límite máximo tolerable de 1000 µg/día para toda la población adulta.

A día de hoy, 92 países (Wilson & O'Connor, 2022) cuentan con políticas de fortificación obligatorias (Figura 4) que han resultado reducir y prevenir los DTN al nacimiento (Wilson & O'Connor, 2021). Sin embargo, una revisión sistemática reciente (Ledowsky et al., 2022) ha evidenciado que la fortificación podría estar produciendo la ingesta en exceso de ácido fólico, es decir, por encima del límite máximo tolerable.

**Figura 4.** Países con legislación obligatoria sobre fortificación (datos actualizados a julio 2022).



**Fuente:** Food Fortification Initiative (Food Fortification Initiative., 2022), disponible en: <https://www.ffinetwork.org/globalprogress>

Actualmente, la dosis recomendada de sAF durante el período periconcepcional es de 400 µg/día para todas aquellas mujeres que estén planeando quedarse embarazadas (Merrell & McMurry, 2022), tratando de no sobrepasar el límite máximo tolerable de 1000 µg/día, a excepción de aquellas situaciones en que esté justificada una prescripción médica de dosis más elevadas. Se han realizado varios estudios para explorar los beneficios del uso materno de las dosis recomendadas de sAF durante el embarazo sobre la salud de los hijos/as. Uno de los estudios que más evidencia científica aporta al respecto, es un metaanálisis publicado muy recientemente (H. Chen et al., 2021). En él se incluyeron 32 estudios de cohortes y 7 estudios de casos y controles, concluyendo que el uso recomendado de sAF incrementa las habilidades intelectuales de los hijos/as, así como reduce el riesgo de Trastorno del Espectro Autista (TEA), Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH), alteraciones conductuales (emocionales, como desánimo, nerviosismo ante situaciones nuevas o ganas de llorar; y/o comportamentales, como perder el control durante un enfado, pelearse o mentir) y alteraciones del lenguaje en la infancia.

## DOSIS ALTAS Y BAJAS DE sAF DURANTE EL EMBARAZO

A pesar de las recomendaciones y el claro papel preventivo frente a los DTN del uso de sAF durante el embarazo, varios países han reportado altos porcentajes de madres que no cumplen con las recomendaciones (Caffrey et al., 2019). Estudios previos publicados han indicado que un 42.8% de madres en Polonia (Wojtowicz et al., 2022) y un 55% de madres en Reino Unido (Shields et al., 2022) no usaron sAF durante el período periconcepcional. En Italia, se ha mostrado que solo un 14% de madres usaron la dosis recomendada de sAF durante el período periconcepcional y, además, un 27,5% usaron 5000 µg/día o más, superando el límite máximo tolerable (Missanelli et al., 2022). En España, un estudio realizado con población del proyecto INMA ha mostrado que más de la mitad de las madres (57%) usaron dosis de sAF por debajo de 400 µg/día durante el período periconcepcional, es decir, no alcanzaron a usar la dosis recomendada, y el 29% superaba el límite máximo tolerable de 1000 µg/día (Navarrete-Muñoz et al., 2015).

A día de hoy, todavía hay muchas madres que no utilizan las dosis recomendadas de sAF durante el embarazo, pudiendo así afectar al correcto desarrollo del feto. Esto se debe a que el cerebro durante su desarrollo temprano es muy vulnerable a factores internos y externos, como la ingesta de sAF, que pueden alterar su correcto desarrollo durante el período embrionario/fetal (Vohr et al., 2017). La evidencia científica ha mostrado que tanto el uso de dosis por encima del límite máximo tolerable, como por debajo de la dosis diaria recomendada, podrían producir cambios a nivel cerebral y, por tanto, producir diferentes trastornos tras el nacimiento (Rubini et al., 2021).

El uso de dosis bajas de sAF (<400 µg/día) durante el embarazo se ha asociado con diversas alteraciones en la salud de los hijos/as. Por un lado, ha mostrado incrementar el riesgo de alteraciones estructurales y/o antropométricas, como bajo peso al nacimiento (Avram et al., 2022), pie zambo (Zhang et al., 2021), labio leporino (Ahmed Sakran et al., 2022), anomalías congénitas del tracto urinario (Czeizel, 2009) o alteraciones cardíacas congénitas (Tyagi et al., 2022). Por otro lado, se ha asociado

a alteraciones relacionadas con el neurodesarrollo, incluyendo un menor tamaño del cerebro, así como alteraciones de memoria, lenguaje y psicológicas (Virdi & Jadavji, 2022). En esta línea, hay estudios que han mostrado un incremento del riesgo de desarrollar TEA (Sampaio et al., 2021), TDAH (Schlotz et al., 2010), alteraciones verbales y visoespaciales (Ars et al., 2019), menor índice de desarrollo mental (del Río García et al., 2009), e incluso problemas emocionales (D'Souza et al., 2019), durante la infancia.

El uso de dosis altas de sAF ( $\geq 1000 \mu\text{g}/\text{día}$ ) también se ha relacionado con algunas alteraciones en la salud de la descendencia, aunque la evidencia científica al respecto es inconclusa y contradictoria. Por un lado, las dosis altas de sAF durante el embarazo se han asociado a efectos perjudiciales en la salud de la descendencia. Una revisión publicada en 2017 describió que el uso de dosis altas durante el embarazo podría incrementar el riesgo de desarrollar TEA (Wiens & DeSoto, 2017). En este sentido, los resultados de un estudio prospectivo de cohorte que incluyó 1257 pares de madres-hijos/as de Boston, mostraron que las madres que reportaron tomar más de 5 veces a la semana sAF y/o cuyos valores de folato en sangre fueron  $\geq 60.3$  nanomoles por litro, ambos indicadores de un uso muy alto de sAF, tuvieron un 2.5 más de riesgo de tener hijos/as con TEA que las madres que tuvieron un consumo moderado de sAF (Raghavan et al., 2018). Las dosis muy altas de sAF,  $> 5000 \mu\text{g}$  al día durante el embarazo se han asociado con alteraciones psicomotoras de los niños/as al año de edad (Valera-Gran et al., 2014). De forma similar, otros estudios han evidenciado que el uso de dosis  $\geq 1000 \mu\text{g}$  al día durante el embarazo se han asociado con un mayor riesgo de ser pequeño para la edad gestacional al nacimiento (Navarrete-Muñoz et al., 2019); así como con peor función cognitiva en general y función verbal, a los 5 años de edad (Valera-Gran et al., 2017).

Por otra parte, hay evidencia que sugiere que las altas dosis de sAF durante el embarazo podrían tener un efecto protector o beneficioso en algunas patologías en la infancia, poniendo de manifiesto que los resultados en cuanto a los efectos de las altas dosis de sAF durante el embarazo son inconclusos. Entre estos efectos beneficiosos, destacan una disminución en la recurrencia de labio leporino al nacimiento derivada del uso de dosis  $> 3000 \mu\text{g}$  al día (Jayarajan et al., 2019), menor incidencia de partos pretérmino (Papadopoulou et al., 2013) y menor riesgo de ser pequeño para la edad gestacional al nacimiento tras el uso de  $5000 \mu\text{g}$  al día durante el embarazo (Papadopoulou et al., 2013) y, también, mejor destreza verbal y habilidades comunicativas a los 18 meses de edad tras el uso de  $5000 \mu\text{g}$  al día, aunque no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con el uso  $> 5000 \mu\text{g}$  al día y la función verbal (Chatzi et al., 2012).

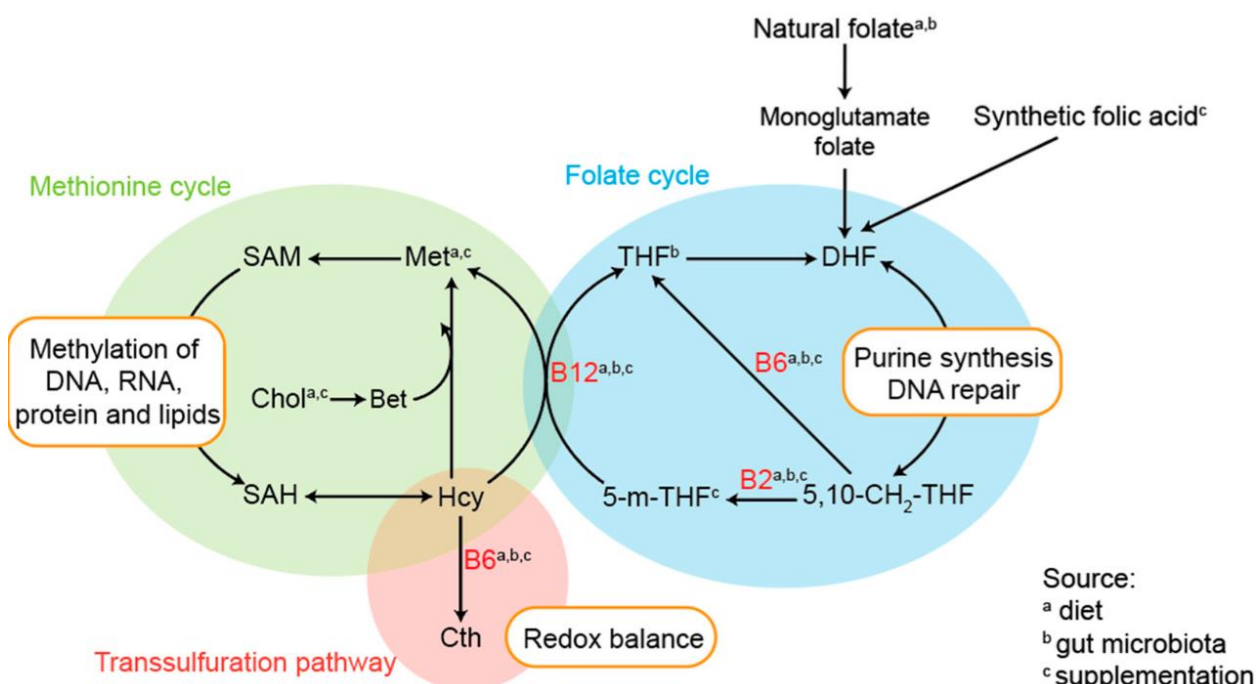
A pesar de que son necesarios más estudios que confirmen los efectos negativos del uso de sAF en dosis altas y bajas durante el embarazo en la salud de la descendencia, la evidencia disponible sugiere que este uso parece tener un impacto negativo en la salud de los hijos/as. En general, los estudios se centran en los efectos del uso alto y bajo de sAF sobre los procesos cognitivos o del neurodesarrollo durante la infancia, pudiéndose deberse esto a que el ácido fólico tiene un papel clave en numerosos procesos neurofisiológicos que ocurren durante la formación, crecimiento y desarrollo embrionario, fetal e incluso tras el nacimiento (Rubini et al., 2021).

## PAPEL DEL ÁCIDO FÓLICO EN EL DESARROLLO TEMPRANO DEL CEREBRO

La gestación es un período de gran vulnerabilidad para el feto, durante el cual los órganos se encuentran en desarrollo, teniendo mayores tasas de proliferación celular, cambios en las capacidades metabólicas y una capacidad limitada para la reparación del ADN (Pachkowski et al., 2011; Šrám et al., 2005). Durante el período embrionario, el cerebro sufre una rápida formación y desarrollo, produciéndose una alta proliferación y migración neuronal, sinapsis, mielinización y apoptosis (Tau & Peterson, 2010), que se conoce como desarrollo temprano del cerebro. Este desarrollo temprano es muy vulnerable a factores externos y cambios en los micronutrientes, que pueden alterarlo y desembocar en trastornos del niño/a tras el nacimiento (Vohr et al., 2017).

Uno de los micronutrientes más importantes en relación con el óptimo desarrollo temprano del cerebro es el ácido fólico. De forma resumida, este micronutriente se absorbe en el intestino delgado materno, donde tras varios procesos químicos es oxidado y reducido a la forma 5-metil-tetrahidrofolato (5-MTHF) (L. N. Zhao & Kaldis, 2022), que se almacena principalmente en el hígado materno (Bahous et al., 2017). Este proceso se incluye en una ruta metabólica conocida como ciclo de folato, que a su vez se incluye en otra ruta metabólica mayor, el metabolismo de un carbono ( $C_1$ ) o "*one-carbon metabolism*" (Rubini et al., 2021) (Figura 5), que además del ciclo de folato, incluye el ciclo de metionina y el de glutatión (Clare et al., 2021). El ciclo de folato es necesario para procesos neurofisiológicos más complejos que tienen lugar principalmente durante el período embrionario, como la metilación de ADN y de ácido ribonucleico (ARN), la síntesis de neurotransmisores y el metabolismo de aminoácidos (Bailey et al., 2015; Clare et al., 2019). Por ello, es esencial un aporte óptimo de sAF durante el embarazo que asegure el correcto desarrollo temprano del cerebro (Jankovic-Karasoulos et al., 2021).

**Figura 5.** Metabolismo de C<sub>1</sub>.



**Fuente:** Maternal One-Carbon Metabolism during the Periconceptional Period and Human Foetal Brain Growth: A Systematic Review (Rubini et al., 2021).

Las alteraciones en el metabolismo de C<sub>1</sub> en relación al ácido fólico, se asocian a problemas comportamentales, cognitivos e incluso psicosis durante la infancia (Freedman et al., 2021). Los efectos de estas alteraciones han sido principalmente estudiados en el período periconcepcional de embarazo, período en el que se enfocan las recomendaciones de uso de sAF. Durante el primer trimestre de embarazo, aproximadamente 6 semanas tras la concepción, se produce el cierre del tubo neural, estructura anatómica que posteriormente se convertirá en la médula espinal y cerebro (sistema nervioso) adultos, siendo por ello el momento más vulnerable y crítico para la ocurrencia de DTN dentro del desarrollo temprano del cerebro (Zaganjor et al., 2016). Por esta razón es fácil pensar que el período periconcepcional de embarazo es el más sensible a las diferentes dosis de sAF, sin embargo, la literatura científica emergente apunta a que el período de embarazo más allá del primer trimestre también podría ser susceptible a las concentraciones de ácido fólico y, relevante para el correcto desarrollo temprano del cerebro.

El segundo y tercer trimestre de embarazo, también conocidos como embarazo medio-avanzado, se describen como un período crucial para el desarrollo del cerebro (Tamura et al., 2005). Durante este período, hay ciertas áreas del cerebro, como el hipocampo o las cortezas visual y auditiva (Georgieff et al., 2018), que se encuentran en pleno desarrollo y requieren de ácido fólico para su correcta formación (Roffman, 2018). También hay una mayor intensidad de mielinización del cerebro, proceso que permite la correcta comunicación entre neuronas, y que es especialmente sensible a la falta de



ácido fólico (Gilmore et al., 2018; Naninck et al., 2019). Estos procesos íntimamente relacionados con el desarrollo temprano del cerebro, y que también dependen del uso materno de sAF, han servido de base y justificación para estudiar cómo las dosis de sAF durante el embarazo avanzado afectan a los procesos neurológicos tras el nacimiento. Un estudio realizado en Holanda, ha mostrado que la deficiencia de sAF en el segundo trimestre se asocia con un menor volumen cerebral de los niños/as a los 6-8 años de edad, evaluado con resonancia magnética (Ars et al., 2019). En la misma línea, los resultados de un estudio realizado en la India muestran que las madres con niveles de folato bajo en el tercer trimestre de embarazo, en comparación a las madres con los niveles adecuados, tuvieron hijos/as con peor rendimiento cognitivo a los 9-10 años de edad (Veena et al., 2010). Por tanto, aunque escasa, hay evidencia que sustenta que las dosis altas y bajas de sAF durante estadios más avanzados del embarazo también pueden influenciar el correcto desarrollo temprano del cerebro de niños/as.

Cabe destacar, que el desarrollo temprano del cerebro presenta algunas peculiaridades dependiendo del sexo del hijo/a, derivadas principalmente de los cromosomas sexuales y las diferencias hormonales (Gilmore et al., 2018). Estas diferencias en el desarrollo temprano del cerebro entre niños y niñas producen que los efectos del uso de dosis de altas y bajas de sAF durante el embarazo puedan ser diferentes, dependiendo del sexo de la descendencia. En este sentido, en el estudio realizado en la India que hemos nombrado anteriormente (Veena et al., 2010), se pudo observar que las madres que tomaron la dosis recomendada de sAF durante el segundo-tercer trimestre de embarazo frente a las que tomaron dosis bajas, tuvieron hijos/as con mejor rendimiento cognitivo en general, e hijas con una mejor fluencia verbal a los 9-10 años de edad. Resultados muy similares se pueden observar en un estudio publicado recientemente, en el que las madres que usaron dosis recomendadas de sAF durante el embarazo avanzado, tuvieron hijas con una mejor comprensión verbal a los 11 años de edad (Caffrey et al., 2021).

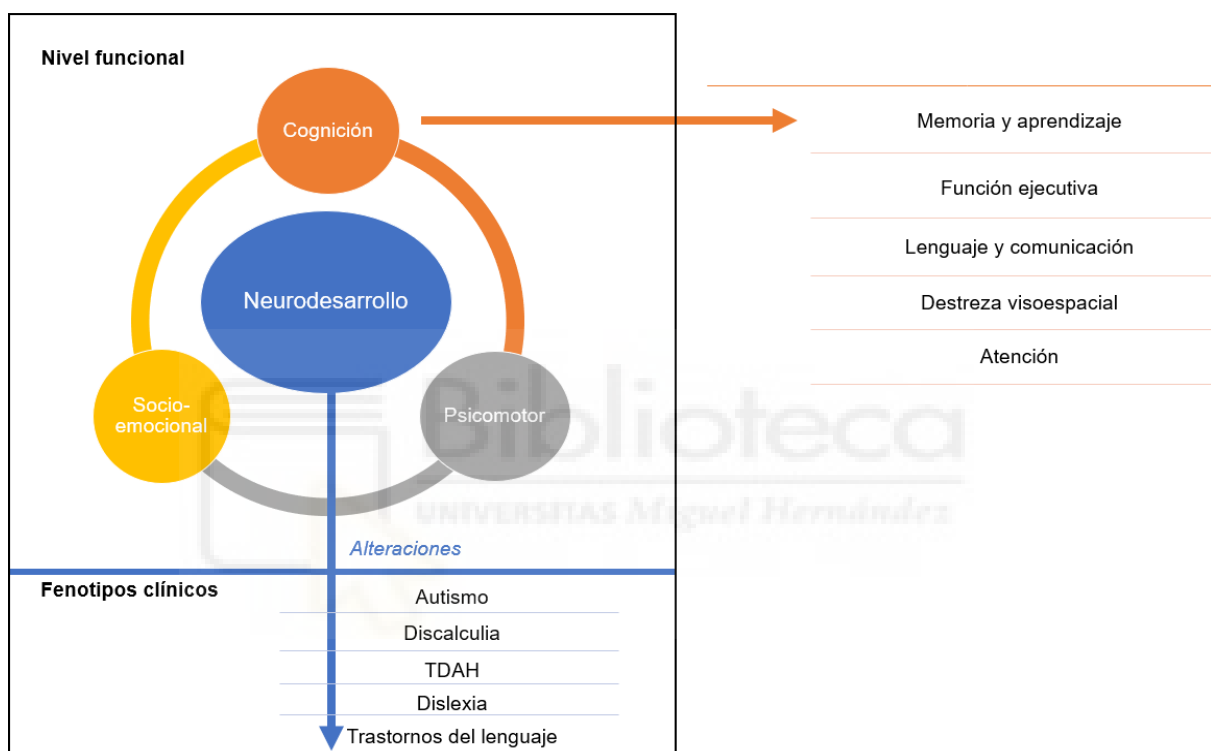
## **FUNCIÓN COGNITIVA**

Como hemos desarrollado hasta este punto, las alteraciones en el desarrollo temprano del cerebro pueden determinar la aparición de diferentes enfermedades y/o trastornos durante la infancia, e incluso en la vida adulta (Godfrey & Barker, 2001; Hanson & Gluckman, 2008). Entre estos trastornos, destacan por la posible influencia del uso materno de sAF, los trastornos del neurodesarrollo. Éstos son un conjunto de trastornos que se caracterizan por retrasos en la adquisición de habilidades motoras, sociales, del lenguaje y/o cognitivas (Jeste, 2015).

Los trastornos (y/o alteraciones) del neurodesarrollo cuentan con diversas definiciones y clasificaciones, que se usan de forma indistinta en el mundo de la epidemiología del desarrollo neuropsicológico infantil. Esta es una de las razones por las que en 2012 Joan Forns et al. realizaron una revisión de la literatura para crear un marco conceptual y unificar la terminología al respecto (Forns et al., 2012). De forma muy resumida, este marco conceptual concibe el neurodesarrollo como dos partes bien diferenciadas: nivel funcional y fenotipos clínicos. Por un lado, el nivel funcional incluye tres dominios interrelacionados entre sí, el cognitivo, el psicomotor y el socioemocional. Estos dominios son

habilidades que se adquieren durante la maduración del cerebro y su interacción con el entorno social y educativo, como resultado del desarrollo de redes neuronales en el cerebro a lo largo del tiempo. El óptimo desarrollo de cada uno de estos dominios, es interdependiente entre ellos, es decir, el desarrollo patológico de uno de ellos, puede influenciar al resto de dominios. Por otro lado, los fenotipos clínicos comprenden la externalización de las posibles alteraciones en alguno de los dominios funcionales, es decir, la sintomatología, pudiendo ser diagnosticada bajo algún trastorno, como por ejemplo TDAH (Bishop & Rutter, 2008) (Figura 6).

**Figura 6.** Marco teórico neurodesarrollo.



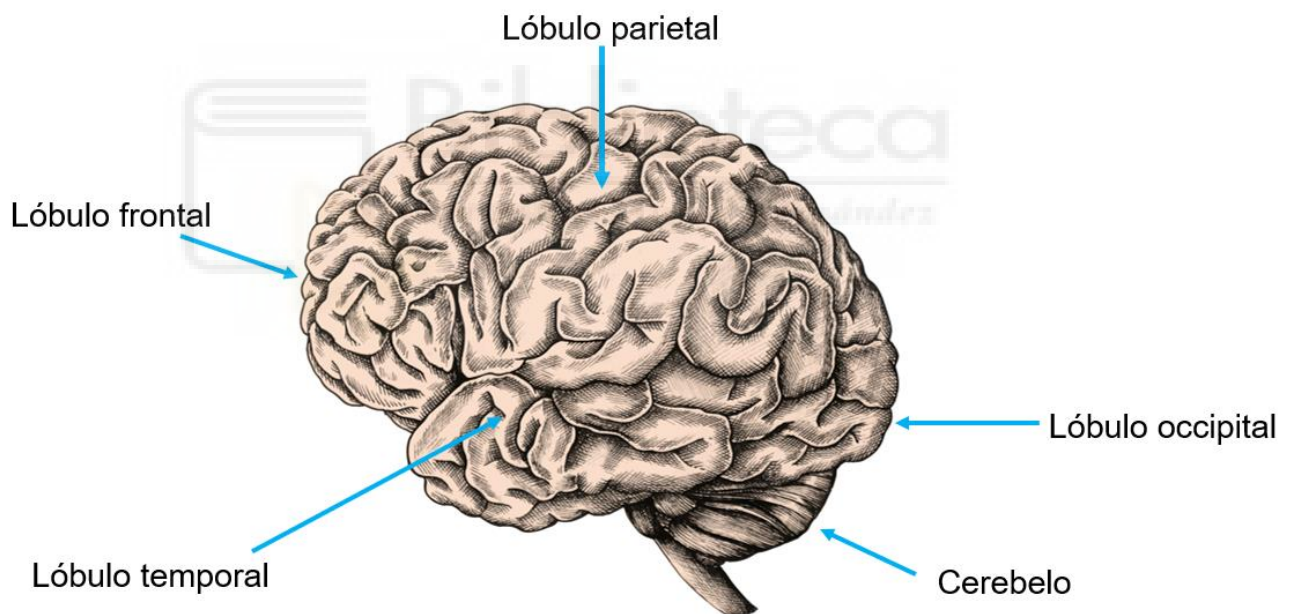
**Fuente:** Elaboración propia a partir del Marco Conceptual de J. Forns et al (Forns et al., 2012).

Dentro de la amplitud de funciones que componen y/o dan lugar a trastornos del neurodesarrollo, vamos a centrarnos en la función cognitiva. La función cognitiva se concibe como un modelo jerárquico, en el que se incluyen diferentes funciones específicas, como la función atencional, el lenguaje o la memoria, que se englobarían dentro del dominio de la cognición general. La función cognitiva general, de forma muy resumida, comienza su desarrollo durante el período embrionario, paralelamente al desarrollo del sistema nervioso central, que da inicio con la formación y cierre del tubo neural (Stiles & Jernigan, 2010). Una vez formado el tubo neural, todas las neuronas se encuentran en el mismo sitio, pero deben desplazarse a sus lugares de destino y desarrollar su función concreta, estos procesos se conocen como migración y especialización neuronal, y darán lugar a las diferentes áreas cerebrales y sus respectivas redes neuronales (Tau & Peterson, 2010). El pico más alto de actividad migratoria de las neuronas se da entre los meses 3 y 5 de gestación (Tau & Peterson, 2010). Tras la formación de las

distintas redes neuronales, éstas deben poder comunicarse entre sí, para coordinar todas las funciones cerebrales y cognitivas. Esto lo hará posible un proceso denominado mielinización, que da comienzo en el tercer trimestre de embarazo y continúa desarrollándose durante la adolescencia y edad adulta (Hüppi et al., 1998). Es importante destacar que estos procesos son muy vulnerables a la nutrición materna, y la inadecuación de la dieta durante el embarazo puede alterar tanto la morfología del cerebro como los futuros procesos cognitivos de los niños/as (Harding et al., 2017).

Por tanto, la correcta función cognitiva depende de una comunicación e interconexión eficiente de los cuatro lóbulos cerebrales: frontal, temporal, parietal y occipital (Figura 7). No obstante, cada uno de los lóbulos se encarga de funciones cognitivas específicas, siendo el más relevante en cuanto a los procesos cognitivos en general, el lóbulo frontal (Nieoullon, 2002; Thomas Yeo et al., 2011).

**Figura 7.** Lóbulos cerebrales.

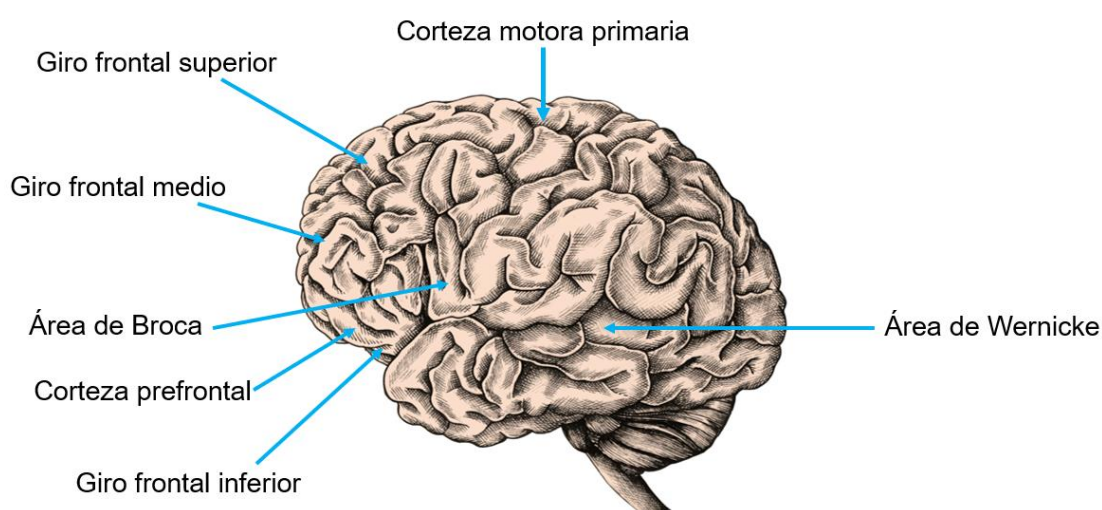


**Fuente:** Modificada a partir de Imagen de rawpixel.com en Freepik <a href=[https://www.freepik.es/vector-gratis/cerebro-humano-dibujado-mano\\_2783045.htm#query=cerebro%20humano&position=5&from\\_view=search&track=sph](https://www.freepik.es/vector-gratis/cerebro-humano-dibujado-mano_2783045.htm#query=cerebro%20humano&position=5&from_view=search&track=sph) >

Es importante tener en cuenta que los lóbulos frontales, aunque son los más relevantes, no trabajan de forma aislada ni solitaria, sino que están interrelacionados con el resto de lóbulos y áreas cerebrales que les brindan soporte. Los lóbulos parietales se encargan de integrar información del exterior, derivarla a la CPF y dar una respuesta en forma de movimiento o acción a la información recibida (Clark et al., 2017). Las funciones cognitivas que se modulan en este lóbulo son el esquema corporal, el procesamiento visoespacial, cálculo, atención, orientación y lenguaje (Centre for Educational Research and Innovation & Organisation for Economic Co-operation and Development, 2007). Los lóbulos temporales se encargan principalmente de recibir y procesar estímulos auditivos, así como de colaborar en la correcta fluencia verbal y comprensión del lenguaje (Zaidat et al., 2020). Estas habilidades son posibles gracias al área de Wernicke, situada en los lóbulos temporales, que nos permite entender el contenido emocional de las palabras y la entonación del lenguaje (Hall, 2020). Además del lenguaje, tiene una importante relación con la memoria (Moscote-Salazar et al., 2020). Por último, el lóbulo occipital se encuentra en la parte posterior del cerebro y se encarga exclusivamente de procesar e integrar los estímulos visuales (Moscote-Salazar et al., 2020).

Los lóbulos frontales son los más grandes del cerebro humano, definen la personalidad de cada persona y están formados por la corteza motora y por la corteza prefrontal (CPF) (Mendez, 2022). (Figura 8). La corteza motora se encarga de la iniciación, coordinación y secuenciación de movimientos corporales en base a las demandas del entorno (Mendez, 2022). La CPF, ocupa cerca de un 30% de toda la corteza cerebral y se ha descrito como la más implicada en el correcto desarrollo de gran parte de las funciones cognitivas específicas (Shallice, 2002): lenguaje, interacción social, funciones ejecutivas, memoria de trabajo y función atencional.

**Figura 8.** Lóbulos frontales.

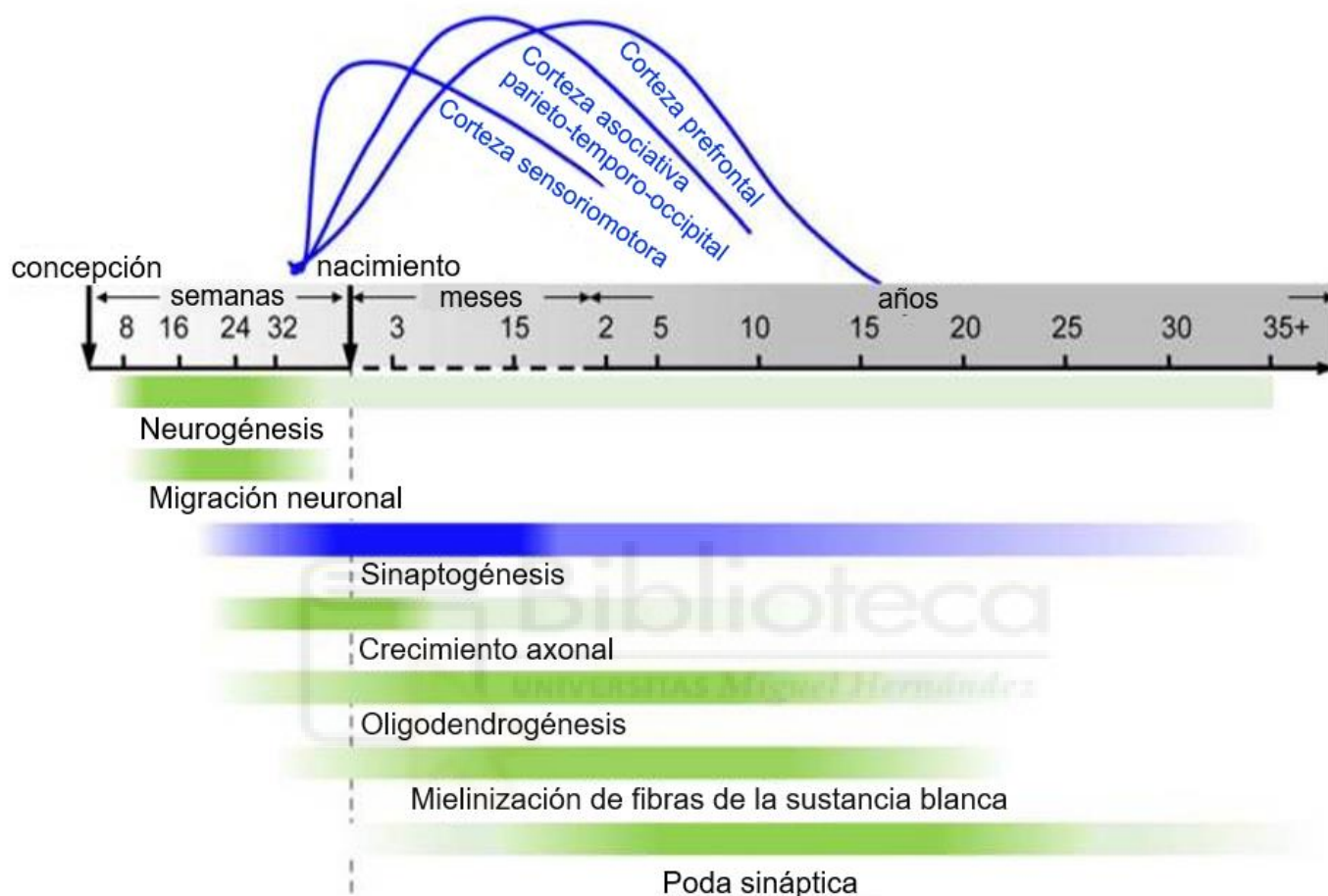


**Fuente:** Modificada a partir de Imagen de rawpixel.com en Freepik <a href=[https://www.freepik.es/vector-gratis/cerebro-humano-dibujado-mano\\_2783045.htm#query=cerebro%20humano&position=5&from\\_view=search&track=sph](https://www.freepik.es/vector-gratis/cerebro-humano-dibujado-mano_2783045.htm#query=cerebro%20humano&position=5&from_view=search&track=sph) >

En cuanto al lenguaje, en la CPF se encuentra el área de Broca, región específica del lenguaje motor, que permite la correcta articulación de palabras (Clark et al., 2017). En cuanto a la interacción social, la CPF tiene la función de integrar las emociones y el comportamiento social, es decir, nos permite interactuar con nuestros iguales, ayudándonos a deliberar posibles respuestas tanto conductuales como verbales y a inhibir aquellas respuestas consideradas inadecuadas (Clark et al., 2017). La CPF también tiene un papel clave en el correcto funcionamiento de las funciones ejecutivas. Estas funciones, se consideran funciones cognitivas superiores e incluyen procesos como la planificación, toma de decisiones y resolución de problemas (Flores-Lázaro & Ostrosky-Solís, 2012), que son la base de un correcto razonamiento, juicio y comportamiento. Las funciones ejecutivas nos permiten ser funcionales en escenarios cotidianos, aunque no sería posible esta funcionalidad sin la ayuda de otras dos funciones cognitivas específicas, que se interrelacionan con las funciones ejecutivas, como lo son la memoria de trabajo y la función atencional. La memoria de trabajo y la atención son dos funciones cognitivas íntimamente relacionadas, pues es necesaria una correcta atención para que la memoria de trabajo funcione correctamente. La memoria de trabajo, también conocida como memoria a corto plazo, puede definirse como el proceso mental por el cual almacenamos, gestionamos y utilizamos la información sobre la cual estamos prestando atención (Ruiz-Martín, 2020), que a su vez se define como la capacidad de mantener un estado de alerta suficiente como para seleccionar y procesar los estímulos relevantes de nuestro entorno para responder a ellos de forma eficaz, mientras obvia los estímulos no relevantes (Nobre & Kastner, 2014). Siendo ambas, funciones cognitivas esenciales para el correcto funcionamiento diario tanto de personas adultas como de adolescentes y niños/as (Spencer-Smith & Klingberg, 2015).

En resumen, la función cognitiva nos permite dar respuesta a las demandas del entorno de una forma funcional. Su formación comienza durante el período embrionario, de forma paralela al desarrollo del sistema nervioso, aunque no todas las funciones cognitivas se inician en el mismo período, pues la maduración y desarrollo de cada lóbulo cerebral es diferente (Figura 9). Muchas de ellas continúan formándose durante la adolescencia y adultez temprana, como es el caso de la función ejecutiva (Diamond, 2002). Detectándose, por tanto, las deficiencias en ciertas habilidades cognitivas en edad escolar, aumentando así el riesgo de problemas conductuales o fracaso académico durante la adolescencia, e incluso de desventajas socio-económicas en la edad adulta (Curtin et al., 2014). Por ello, es de vital importancia el estudio de las causas que pueden producir estos trastornos, con el fin de controlarlas, minimizar su impacto en la salud de la descendencia e intervenir de la forma más temprana posible, asegurando la funcionalidad diaria de niños y niñas.

**Figura 9.** Maduración de los lóbulos cerebrales desde la concepción hasta la edad adulta.



**Fuente:** Traducida a partir de Delineation of early brain development from fetuses to infants with diffusion MRI and beyond (Ouyang et al., 2019).

## JUSTIFICACIÓN

---

La nutrición materna durante el embarazo, incluyendo el uso de suplementos vitamínicos, ha sido descrita como un factor influyente y relevante en el desarrollo embrionario, fetal e incluso tras el nacimiento. El uso en dosis recomendadas de sAF durante el período periconcepcional posee un fundamento científico sólido al haberse asociado con un efecto protector en la salud de la descendencia, especialmente en el neurodesarrollo gracias a su papel preventivo frente a los DTN al nacimiento. Sin embargo, la literatura emergente apunta a que el uso de sAF durante los períodos de embarazo más allá del primer trimestre también parece influir en el correcto desarrollo neurológico, relacionándose el uso recomendado de sAF a partir del período periconcepcional con una mejor función cognitiva de los hijos/as.

El desarrollo temprano del cerebro es muy vulnerable a factores maternos, como la dieta, teniendo el ácido fólico un papel clave en su correcto desarrollo. El ácido fólico interviene en diversos procesos neurofisiológicos durante el desarrollo embrionario, como la metilación del ADN, que son muy sensibles a las concentraciones de esta vitamina. Hay varios estudios que respaldan que el uso de dosis bajas de sAF se asocia a una peor función cognitiva durante la infancia, así como a un mayor riesgo de sufrir trastornos del neurodesarrollo, como TEA. A pesar de que el ácido fólico se considera una vitamina libre de toxicidad y segura para nuestro organismo, las dosis por encima del límite máximo tolerable se han asociado también a efectos perjudiciales en la función cognitiva de los niños/as, como peor habilidad verbal, mostrando que mayores concentraciones de esta vitamina durante el embarazo, no tienen un impacto positivo en los procesos neurofisiológicos en la infancia.

Hay que destacar que el desarrollo temprano del cerebro, así como la maduración de las funciones cognitivas, son distintas entre niños y niñas, lo que podría producir que el efecto de los sAF durante el embarazo sea diferente entre ellos. En este contexto, algunos estudios han mostrado que continuar con el uso recomendado de sAF tras el primer trimestre de embarazo produce una mejoría en la función verbal a los 11 años de edad solo en niñas. Estos hallazgos se han justificado parcialmente con resultados de estudios de muestras sanguíneas de cordón umbilical de estos mismos niños/as, que han mostrado que el uso de sAF parece activar la metilación de genes específicos relacionados con el desarrollo del cerebro en niñas y no en niños. Resultados que podrían proveer de una base biológica para los posibles hallazgos diferenciales del efecto del uso de sAF sobre la función cognitiva entre niños y niñas.

En el marco del estudio INMA, población de estudio de la presente tesis doctoral, ya se han publicado algunos estudios que han explorado el efecto uso de las altas y bajas de sAF durante el embarazo sobre el neurodesarrollo infantil. Por un lado, se ha mostrado un efecto negativo en el dominio psicomotor al año de edad derivado del uso periconcepcional de dosis altas de sAF durante el embarazo. Por otro lado, estas mismas dosis, se han asociado con un déficit verbal a los 5 años de edad, que se engloba en el dominio cognición. Asentando la base para continuar el estudio de los

efectos de las dosis altas y bajas de sAF durante el embarazo en otras funciones específicas incluidas en el dominio cognición, como la función atencional y la memoria de trabajo.

Toda esta evidencia científica sobre los diferentes efectos del uso de dosis altas y bajas de sAF según el sexo de la descendencia y/o según el período de embarazo estudiado, nos sirven de justificación para la realización de esta tesis doctoral. En base a la cual nos surge la siguiente pregunta de investigación: ¿El uso materno de sAF en dosis altas ( $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{día}$ ) y bajas ( $< 400$   $\mu\text{g}/\text{día}$ ) afecta negativamente a la función cognitiva infantil independientemente de que la descendencia sea niño o niña, y del período de embarazo en el que se hayan usado los suplementos?





## HIPÓTESIS

---

Las **hipótesis** están relacionadas con los objetivos planteados y recogidos en los trabajos que forman parte de esta tesis doctoral:

1. El uso de sAF por **encima** ( $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{día}$ ) y por **debajo** ( $< 400$   $\mu\text{g}/\text{día}$ ) de la **dosis recomendada** en el embarazo se asocia de forma independiente a una **peor función cognitiva, concretamente función atencional**, de los niños y las niñas a la edad de **4-5 años**
2. El uso de sAF por **encima** ( $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{día}$ ) y por **debajo** ( $< 400$   $\mu\text{g}/\text{día}$ ) de la **dosis recomendada** durante el embarazo se asocia de forma independiente a una **peor función cognitiva, concretamente función atencional y memoria de trabajo**, de los niños y las niñas a los **7-9 años** de edad.

## OBJETIVOS

---

Los **objetivos** propuestos en esta tesis doctoral son:

### Objetivo general

Analizar la asociación entre el uso de sAF a dosis **altas** ( $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{día}$ ) y **bajas** ( $< 400$   $\mu\text{g}/\text{día}$ ) en el embarazo independientemente de la ingesta dietética y las alteraciones de la **función cognitiva** en niños/as a la edad de **4-5 años** y **7-9 años** estratificando por sexo.

### Objetivos específicos

1. Analizar la asociación entre las **dosis altas** ( $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{día}$ ) y **bajas** ( $< 400$   $\mu\text{g}/\text{día}$ ) de **sAF** en el embarazo independientemente de la ingesta dietética y las alteraciones en la **función atencional** en niños y niñas de **4-5 años** de edad.
2. Evaluar la asociación entre las **dosis altas** ( $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{día}$ ) y **bajas** ( $< 400$   $\mu\text{g}/\text{día}$ ) de **sAF** en el embarazo independientemente de la ingesta dietética y las alteraciones en la **función atencional** y **memoria de trabajo** en niños y niñas de **7-9 años** de edad.

# METODOLOGÍA

## DISEÑO DE ESTUDIO

Esta tesis doctoral se enmarca dentro del Proyecto Infancia y Medio Ambiente (INMA; [www.proyectoinma.org](http://www.proyectoinma.org)) (Guxens et al., 2012). INMA es un estudio de cohorte de nacimiento prospectivo de base poblacional y multicéntrico, con el objetivo principal de estudiar diferentes exposiciones durante el embarazo, como agentes contaminantes, determinantes genéticos y factores dietéticos; sobre el desarrollo fetal y del niño/a tras el nacimiento. El proyecto INMA se establece en siete regiones españolas: Ribera de l'Ebre (n=102), Menorca (n=530), Granada (n=668), Asturias (n=494), Guipúzcoa (n=638), Sabadell (n=657) y Valencia (n=855) (Figura 10).

**Figura 10.** Localización geográfica de las siete cohortes que conforman el Proyecto INMA.



**Fuente:** Web del Proyecto INMA ([www.proyectoinma.org](http://www.proyectoinma.org)).

Las cohortes de Ribera de l'Ebre, Menorca y Granada son las cohortes iniciales, que sirvieron de punto de partida y experiencia previa para crear las restantes cuatro cohortes (Asturias, Valencia, Guipúzcoa y Sabadell) que siguieron un protocolo común de estudio, incluyendo aspectos similares en cuanto a reclutamiento, recogida de datos y seguimiento de participantes. Esta es la razón por la cual, para los dos artículos que conforman esta tesis doctoral, se ha utilizado únicamente la población de estudio e información recogida en las cuatro cohortes nuevas: Valencia, Asturias, Sabadell y Guipúzcoa.

El proyecto INMA está aprobado por los comités éticos de los hospitales de referencia de cada una de las cuatro cohortes (Hospital La Fe, Valencia; Hospital Sabadell, Sabadell; Hospital Universitario Central de Asturias, Asturias; Hospital Zumárraga, Guipúzcoa), así como por el Comité ético del Institut Municipal d'Investigació Mèdica.

## POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio del proyecto INMA son las madres embarazadas que viven en las diferentes zonas geográficas de cada cohorte participante; así como sus hijos/as. En las cohortes nuevas, las madres embarazadas se reclutaron en la primera visita prenatal, entre los años 2004 y 2008 (Gascon et al., 2017; Guxens et al., 2012). Para participar, además de cumplimentar el consentimiento informado y aceptar la participación, las madres debían cumplir los siguientes criterios de inclusión:

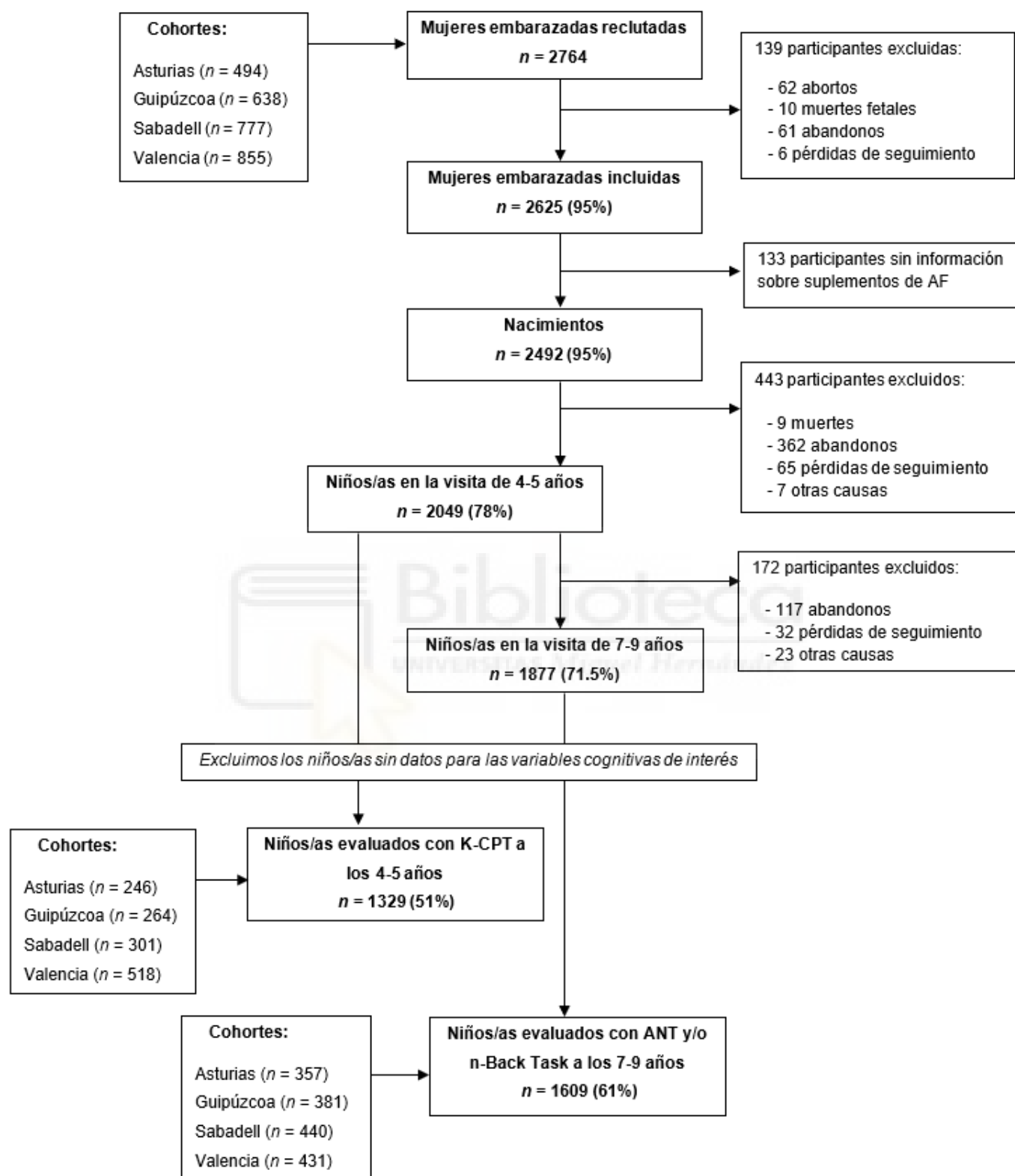
- [1] Tener 16 años o más.
- [2] No tener problemas de comunicación (hablar y entender el español).
- [3] Tener un embarazo único.
- [4] Dar a luz en alguno de los hospitales de referencia de las cohortes participantes.
- [5] Embarazo natural, sin técnicas de reproducción asistida.
- [6] Residir en el área de estudio (dependiente de cada cohorte).

Tras el reclutamiento, se realizaron diferentes visitas de seguimiento (Figura 11) y de recogida de información. Las visitas de seguimiento de especial interés para esta tesis doctoral fueron: visita inicial, visita durante el embarazo (primer trimestre, segundo trimestre, tercer trimestre), visita de los 4-5 años de edad de los hijos/as y visita de los 7-9 años de edad de los hijos/as.

Fueron 2764 mujeres las que aceptaron participar en el proyecto INMA, de las cuales 2625 fueron incluidas en el estudio; y, de éstas, 2492 dieron a luz a un bebé vivo. Para el primer artículo que compone esta tesis doctoral, analizamos 1329 pares de madres-hijos/as con información completa sobre el uso de sAF durante el embarazo y sobre la función atencional a los 4-5 años de edad de los niños/as. Para el segundo artículo que compone esta tesis doctoral, analizamos 1609 pares de madres-hijos/as con información completa sobre el uso de sAF durante el embarazo y sobre aspectos cognitivos (memoria de trabajo y/o función atencional) a los 7-9 años de edad de los niños/as (Figura 12).



**Figura 12.** Flujo de participantes de los dos estudios que componen esta tesis doctoral.



**Fuente:** Elaboración propia.

## VARIABLES DE ESTUDIO

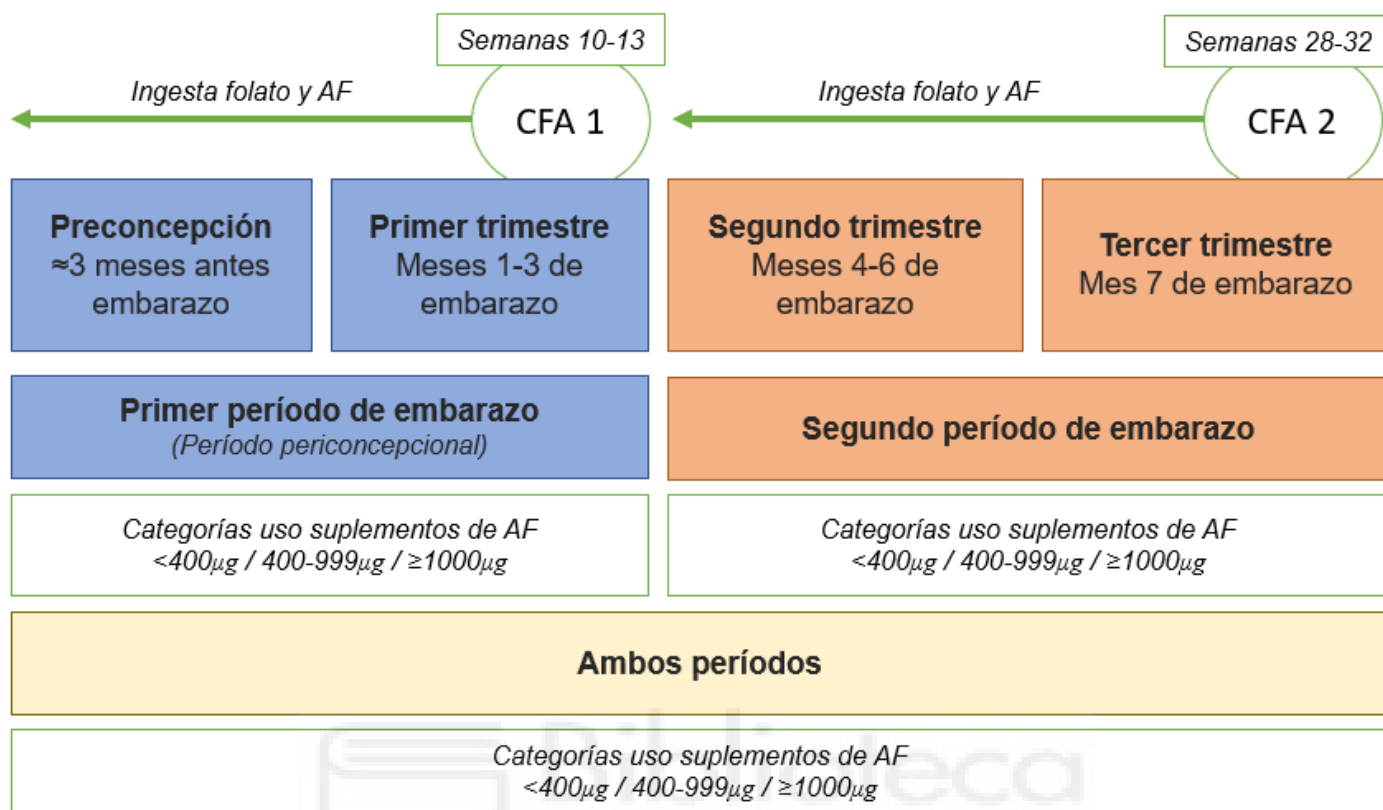
### *Uso de sAF*

La recogida de información sobre el uso de sAF se realizó por trabajadores de campo entrenados para ello a través de un cuestionario semicuantitativo de frecuencia de alimentos (CFA) de 101 ítems. El CFA que se usó es una versión adaptada del cuestionario utilizado por Willett en el estudio de las Enfermeras Norteamericanas (Willett et al., 1985), el cual ha sido diseñado para mujeres embarazadas españolas y validado en la población perteneciente a la cohorte INMA-Valencia del proyecto INMA (Vioque et al., 2013), disponible en: <http://epinut.edu.umh.es/cfa-101-inma-embarazadas/> (Anexo 1). El contenido de folato y demás nutrientes procedentes de los alimentos se obtuvo principalmente de las tablas de composición de alimentos norteamericanas (U.S. Department of Agriculture (USDA), 2010) y se complementó con otras fuentes relevantes nacionales (Palma Linares et al., 2008) para adaptarlo a la realidad española. Para calcular la ingesta de nutrientes transformamos la frecuencia de consumo de cada alimento en gramos por día, multiplicamos ésta por la composición nutricional y, por último, dividimos el resultado por el tamaño de las raciones especificadas en el CFA. Se obtuvo la ingesta media diaria de nutrientes para cada mujer a partir de la suma de la ingesta de todos los nutrientes de cada alimento. Asimismo, se utilizó el método de los residuos de Willett (Willett et al., 1997) para calcular los valores de las ingestas de nutrientes ajustados por calorías.

Los nutrientes de especial interés para la presente tesis doctoral fueron el folato (variable de ajuste) y de sAF (variable independiente). Para cada una de las embarazadas se estimó la ingesta dietética media diaria de folato en  $\mu\text{g}$  durante cada uno de los períodos de embarazo evaluados mediante dos CFA. El primer CFA se recogió en la semana 10-13 de embarazo para estimar la ingesta de folato y sAF desde los tres meses previos a la concepción hasta el tercer mes de embarazo (período periconcepcional) y, el segundo CFA, se recogió en la semana 28-32 de embarazo para estimar la ingesta de folato y sAF desde el cuarto hasta el séptimo mes de embarazo (segundo período de embarazo) (Figura 13). Estos CFA incluían preguntas específicas sobre suplementos y/o preparados vitamínicos y minerales que contuvieran ácido fólico. El uso de sAF (en  $\mu\text{g}$ ) se estimó en base a la dosis diaria, la marca comercial, la composición del suplemento y la duración del consumo para cada período del embarazo. Se estimó el uso medio mensual de sAF, y posteriormente, la media de consumo de sAF de cada madre durante el período periconcepcional, segundo período del embarazo y la media de estos dos períodos (embarazo completo). En base a ello, clasificamos el uso de sAF de las madres durante los períodos de embarazo anteriormente mencionados como:  $<400 \mu\text{g}/\text{día}$  (dosis bajas),  $400-999 \mu\text{g}/\text{día}$  (categoría de referencia en nuestros análisis estadísticos) y  $\geq 1000 \mu\text{g}/\text{día}$  (dosis altas).

La estimación de uso de sAF y categorías de consumo han sido las mismas para los dos artículos que conforman esta tesis doctoral.

**Figura 13.** Recogida de información dietética mediante cuestionario de frecuencia de alimentos (CFA).



**Fuente:** Elaboración propia.

### **Función cognitiva**

La variable dependiente estudiada en los dos artículos que componen esta tesis doctoral es la función cognitiva, estudiada a través de la función atencional y la memoria de trabajo. Esta variable se recogió en las visitas de seguimiento de los niños/as cuando tenían 4-5 años de edad (datos usados para el artículo 1) y cuando tenían 7-9 años (datos usados para el artículo 2). Las evaluaciones se realizaron por trabajadores de campos entrenados mediante test computarizados de aproximadamente unos 20 minutos de duración. Todos los niños/as recibieron las mismas instrucciones y fueron evaluados en salas tranquilas.

**Artículo 1: The Use of Lower or Higher Than Recommended Doses of Folic Acid Supplements during Pregnancy Is Associated with Child Attentional Dysfunction at 4–5 Years of Age in the INMA Project.**

Para este primer artículo, la función cognitiva fue explorada mediante la variable función atencional en niños/as de 4-5 años de edad. Este aspecto cognitivo se evaluó con el test de ordenador Conners' Kiddie Continuous Performance test (KCP-T) (Conners & Staff, 2001) de unos 7 minutos duración. Se utilizó la versión adaptada para población infantil, en la que, en lugar de incluir imágenes de letras, se incluyen imágenes más visuales, como por ejemplo un balón de fútbol. Antes de comenzar la prueba, los trabajadores de campo instruyeron a los niños y niñas para pulsar la barra espaciadora del teclado lo más rápido posible cuando vieran una imagen en la pantalla del ordenador (el objetivo), siempre y cuando esa imagen no fuera el balón de fútbol (el no objetivo).

En este artículo analizamos 5 resultados principales provenientes del test K-CPT, que actúan como indicadores de diferentes aspectos/vertientes de la función atencional: tiempo medio de respuesta en milisegundos (HRT), como un indicador de tiempo de reacción; error estándar del HRT [HRT(SE)], como un indicador de atención sostenida; detectabilidad/precisión, como un indicador de precisión durante el test; errores por omisión, como un indicador de inatención; y errores por comisión, como un indicador de impulsividad.

Para todos ellos, excepto para la detectabilidad/precisión, una puntuación mayor, indica un peor resultado (Conners & Staff, 2000, 2001). En la Tabla 2 se encuentran esquematizadas y descritas en mayor detalle estas variables.



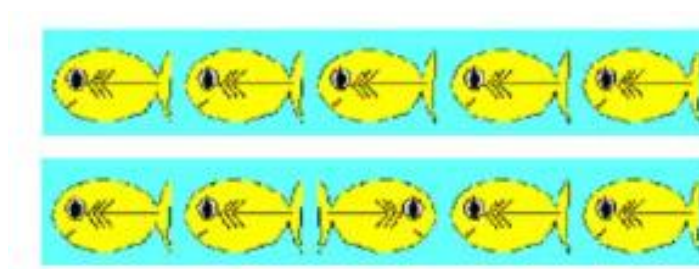
## Artículo 2: Association between the Use of Folic Acid Supplements during Pregnancy and Children's Cognitive Function at 7-9 Years of Age in the INMA Cohort Study

Para este segundo artículo, la función cognitiva fue explorada mediante las variables función atencional y memoria de trabajo en niños/as de 7-9 años de edad. Para evaluar estas funciones cognitivas se usaron dos test diferentes.

### Attentional Network Test (ANT)

Para evaluar la función atencional de los niños/as a los 7-9 años de edad, se utilizó test de ordenador Attentional Network Test (ANT) (Forns et al., 2014; Thomason et al., 2009), ampliamente utilizado para valorar diferentes aspectos de la función atencional. Se trata de una prueba que dura unos 20 minutos, diseñada para evaluar la función atencional de niños/as mayores de 6 años (Rueda et al., 2004). Para esta prueba, los trabajadores de campo instruyeron a los niños/as para que alimentaran al pez central de una fila de cinco peces amarillos. Para alimentar al pez central, los niños/as debían pulsar lo más rápido posible el botón derecho o izquierdo del ratón, dependiendo y coincidiendo con la dirección hacia la que estuviera mirando el pez del centro, tratando de ignorar al resto de peces, que pueden o no mirar en la misma dirección que el pez central. Justo antes de comenzar la prueba, hay un período de fijación, en el que el niño/a debe observar una cruz en la pantalla del ordenador, para asegurar en la medida de lo posible esté mirando a la parte de la pantalla en la que saldrá la fila de peces (Figura 14). Cuando el niño/a realiza la prueba de forma correcta, recibe un refuerzo auditivo positivo “Woo hoo!” (Suades-González et al., 2017).

**Figura 14.** Imagen de los peces que aparecen en el test ANT.



**Fuente:** Development of attentional networks in childhood (Rueda et al., 2004).

Esta prueba fue administrada por trabajadores de campo entrenados, que dieron las mismas instrucciones a todos los niños/as y, en cada cohorte, los niños/as usaron el mismo ordenador. En este artículo analizamos 7 resultados proporcionados por el test ANT: error estándar del tiempo medio de respuesta [HRT(SE)], como un indicador de atención sostenida; detectabilidad/precisión ( $d'$ ), como un indicador de la precisión con la que se ha realizado el test; errores por omisión, como un indicador de

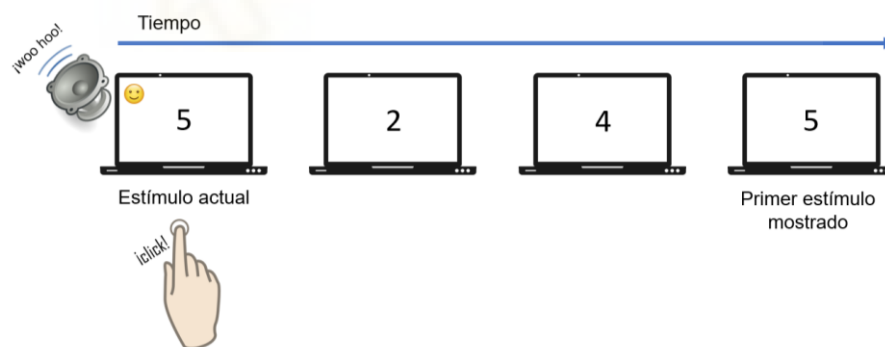
inatención; errores por comisión, como un indicador de impulsividad; y tres redes atencionales (orientación, alerta y ejecutiva).

Para todas las variables, excepto para la detectabilidad/precisión, una puntuación mayor, indica un peor resultado (Arija et al., 2019; Gignac et al., 2021; Suades-González et al., 2017). En la Tabla 2 se encuentran esquematizadas y descritas en mayor detalle estas variables.

### N-Back Task

Para evaluar la memoria de trabajo se utilizó el test de ordenador N-Back Task (Owen et al., 2005). Esta prueba tiene una duración aproximada de 20 minutos, durante la cual se presentan estímulos visuales (en este estudio, números) uno a uno en la pantalla del ordenador. En este test se instruyó al niño/a para que pulsara una tecla del teclado cuando viera un estímulo (un número) igual al mostrado “n” pantallas antes ( $n=1,2$  ó  $3$ ). Para cada estímulo, los niños/as debían completar los 3 bloques: 1-back, 2-back y 3-back, siendo este último el que mayor memoria de trabajo demanda. En el nivel 1-back, el más simple, el niño/a debía pulsar el teclado cuando el número en pantalla fuera el mismo que el mostrado inmediatamente antes. En el nivel 2-back debían pulsar cuando el número en pantalla fuera igual que el mostrado dos pantallas antes y en el nivel 3-back, tres pantallas antes. Después de cada bloque, los niños/as tenían un breve descanso (5-20 segundos), recibían un refuerzo auditivo positivo ("¡woo hoo!") y aparecía una cara sonriente en la parte superior izquierda de la pantalla (Figura 15).

**Figura 15.** Ejemplificación N-Back Task; nivel 3-back.



**Fuente:** Elaboración propia.

En este segundo artículo no se analizaron los datos del nivel más simple (1-back) porque todos los niños/as alcanzaron la perfección (López-Vicente et al., 2016). A partir de las medidas directas que ofrece el N-Back Task, se calculó la precisión global ( $d'$ ) de la siguiente forma;  $d' = z$  (tasa de aciertos) -  $z$  (tasa de falsas alarmas). Una  $d'$  más alta indica una mejor detección, es decir, una mayor capacidad de distinguir “señal” (estímulo objetivo) de “ruido” (estímulo no objetivo) y, por tanto, un rendimiento más preciso durante la prueba (Deserno et al., 2012; Sunyer et al., 2015). En la Tabla 2 se encuentran esquematizadas y descritas en mayor detalle estas variables.

**Tabla 2.** Variables cognitivas exploradas en cada artículo y su batería de medición.

**Artículo 1: The Use of Lower or Higher Than Recommended Doses of Folic Acid Supplements during Pregnancy Is Associated with Child Attentional Dysfunction at 4–5 Years of Age in the INMA Project**

Función cognitiva	Test	Variables analizadas
FUNCIÓN ATENCIONAL	Conners' Kiddie Continuous Performance Test (KCP-T)	<p><b>HRT:</b> tiempo medio de respuesta (milisegundos) (capacidad de reacción) *</p> <p><b>HRT(SE):</b> error estándar del HRT (milisegundos) (variabilidad entre respuestas, atención sostenida) *</p> <p><b>Detectabilidad/precisión:</b> capacidad del niño/a para distinguir un objetivo de un no objetivo (sin unidad) (precisión del test)</p> <p><b>Errores por omisión:</b> número de errores en los que el niño/a no responde al objetivo (contable) (inatención) *</p> <p><b>Errores por comisión:</b> número de errores en los que el niño/a responde varias veces al objetivo o no objetivo (contable) (impulsividad) *</p>

**Artículo 2: Association between the Use of Folic Acid Supplements during Pregnancy and Children's Cognitive Function at 7-9 Years of Age in the INMA Cohort Study**

Función cognitiva	Test	Variables analizadas
FUNCIÓN ATENCIONAL	Attentional Network Test (ANT)	<p><b>HRT(SE):</b> error estándar del HRT (milisegundos) (variabilidad entre respuestas, atención sostenida) *</p> <p><b>Precisión:</b> capacidad del niño/a para distinguir un objetivo de un no objetivo (sin unidad) (precisión del test)</p> <p><b>Errores por omisión:</b> número de errores en los que el niño/a no responde al objetivo (contable) (inatención) *</p> <p><b>Errores por comisión:</b> número de errores en los que el niño/a responde varias veces al objetivo o no objetivo (contable) (impulsividad) *</p> <p><b>Red alerta:</b> Refleja la capacidad de producir y mantener una vigilancia y un rendimiento óptimos durante las tareas (sin unidad) *</p> <p><b>Red ejecutiva:</b> Refleja la detección y resolución de conflictos entre las respuestas, la detección de errores y la inhibición de respuestas (milisegundos) *</p> <p><b>Red orientación:</b> Refleja el cambio de atención a los estímulos sensoriales (sin unidad) *</p>
MEMORIA DE TRABAJO	N-Back Task	<p><b>n-back 1:</b> Capacidad para recordar el estímulo recién presentado (nivel más simple, se eliminó de los análisis porque todos los niños/as alcanzaron la perfección) (sin unidad).</p> <p><b>n-back 2:</b> Capacidad para recordar el penúltimo estímulo presentado (indicador de habilidades cognitivas generales) (sin unidad).</p> <p><b>n-back 3:</b> Capacidad para recordar el antepenúltimo estímulo presentado (indicador de habilidades cognitivas superiores) (sin unidad)</p>

\* Una mayor puntuación indica un peor resultado.

### *Otras variables*

Además de las variables principales, en ambos artículos hemos utilizado información sobre variables sociodemográficas, antropométricas y de estilos de vida que podían actuar como variables confusoras. Estas variables se recogieron de forma presencial, mediante cuestionarios estructurados y por trabajadores de campo entrenados. En relación a la madre, ajustamos los modelos de regresión por cohorte (Asturias; Guipúzcoa; Sabadell; Valencia), edad (en años), ingesta energética (en kilocalorías), clase social (alta, media o baja), nivel educativo (primario o inferior, secundario, universitario), paridad (0, ≥1), exposición global al tabaco (sí/no) que incluye tanto la exposición activa como pasiva durante el embarazo, índice de masa corporal (IMC) pre-embarazo (continuo). En cuanto al padre, tuvimos en cuenta el IMC (continuo); y, en relación a los hijos/as tuvimos en cuenta el sexo (niño, niña) y la edad (en años) en el momento del examen cognitivo.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En los dos artículos que conforman esta tesis, se realizaron los análisis estadísticos con el programa R 3.4.2 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria, <http://www.r-project.org>), estableciendo el nivel de significación estadística en 0.05. En ambos estudios llevamos a cabo análisis descriptivos univariante y bivariante para caracterizar a las madres embarazadas y sus hijos/s según las cuatro cohortes de estudio; análisis multivariante para evaluar la asociación entre el uso de sAF y la función cognitiva; metaanálisis para estimar el efecto combinado de las 4 cohortes de estudio; y análisis de sensibilidad para valorar la robustez de las asociaciones encontradas. Además, dada la evidencia científica que sugiere que el neurodesarrollo durante el período embrionario es distinto entre niños y niñas (Wheelock et al., 2019; Wu et al., 2013), complementamos los análisis multivariantes con modelos estratificados por sexo.

### *Análisis descriptivo*

En cuanto a los análisis descriptivos, en ambos artículos, utilizamos el test de Kolmogorov-Smirnov para valorar la normalidad de las variables cuantitativas, resultando todas no paramétricas. Por ello, las variables cuantitativas se describieron con mediana y rango intercuartílico y se contrastaron hipótesis usando el test Kruskal-Wallis. Las variables categóricas se describieron con n y % y se usó el test Chi-cuadrado para el contraste de hipótesis.

### *Análisis multivariante*

Los análisis multivariantes de ambos artículos se ajustaron por aquellas covariables con un p-valor <0.20 en el análisis bivariante y las que cambiaron la magnitud del efecto en >10%. En cada artículo se realizaron los siguientes análisis:

**Artículo 1: The Use of Lower or Higher Than Recommended Doses of Folic Acid Supplements during Pregnancy Is Associated with Child Attentional Dysfunction at 4–5 Years of Age in the INMA Project.**

En este artículo utilizamos dos modelos de regresión diferentes dependiendo del tipo de variables cuantitativas que representasen la función atencional. Por un lado, llevamos a cabo modelos de regresión lineal robusta múltiple utilizando un estimador Minimizador de las estimaciones basadas en el concepto de máxima verosimilitud (M de Huber) (MM) (Yu & Yao, 2017) para evaluar la asociación entre el uso de sAF y la función atencional de los niños/as, representada por variables cuantitativas continuas del test K-CPT (HRT, HRT(SE) y detectabilidad). Por otro lado, se utilizaron modelos de regresión binomial negativa (Nikoloulopoulos & Karlis, 2008) para estimar las asociaciones entre el uso de sAF y la función atencional, representada por variables cuantitativas discretas del test K-CPT (número de errores por omisión y número de errores por comisión). Los coeficientes de la regresión binomial negativa se exponenciaron para obtener IRR (ratios de tasas de incidencia), que se interpretan como riesgos relativos.

Finalmente, para obtener estimaciones combinadas para las cuatro cohortes de estudio, se utilizó metaanálisis. Utilizamos el estadístico  $I^2$  para cuantificar la heterogeneidad, usando modelos aleatorios cuando detectamos heterogeneidad ( $I^2 > 50\%$ ) y modelos fijos cuando no ( $I^2 \leq 50\%$ ) (Higgins, 2003).

Tanto los modelos de regresión como el metaanálisis se calcularon para los tres períodos de embarazo: periconcepcional, segundo periodo y ambos; así como estratificados por niño y niña.

**Artículo 2: Association between the Use of Folic Acid Supplements during Pregnancy and Children's Cognitive Function at 7-9 Years of Age in the INMA Cohort Study**

Siguiendo las recomendaciones en relación a resultados implausibles en el test ANT, excluimos de los análisis a aquellos niños/as cuya tasa de respuestas correctas era inferior al 70% y/o sus tiempos de reacción eran inferiores a 200 milisegundos (Antón et al., 2014; Gignac et al., 2021).

En este artículo utilizamos tres modelos de regresión diferentes dependiendo del tipo de variables cuantitativas que representasen a la función cognitiva (función atencional y memoria de trabajo). En primer lugar, realizamos modelos de regresión lineal robusta múltiple utilizando un estimador de tipo MM (Yu & Yao, 2017) para evaluar la asociación entre el uso de sAF y la función atencional de los niños/as, representada por variables cuantitativas continuas del test ANT (HRT(SE) y las tres redes atencionales). En segundo lugar, utilizamos modelos de regresión binomial negativa (Nikoloulopoulos & Karlis, 2008) para estimar las asociaciones entre el uso de sAF y la función atencional, representada por variables cuantitativas discretas del test ANT (número de errores por omisión y número de errores por comisión). Los coeficientes de la regresión binomial negativa se exponenciaron para obtener IRR (ratios de tasas de incidencia), que se interpretan como riesgos relativos. En tercer lugar, llevamos a

cabo modelos de regresión lineal para datos censurados (Regresión Tobit) para explorar las asociaciones entre el uso de sAF y la memoria de trabajo y la función atencional, representadas por valores cuantitativos continuos en los que a partir de cierto límite, a todas las respuestas se les asigna un mismo valor (resultados d' n-back 2 y d' n-back 3 del test N-Back Task; y detectabilidad del test ANT).

Finalmente, para obtener estimaciones combinadas para las cuatro cohortes de estudio, realizamos metaanálisis. Utilizamos el estadístico  $I^2$  para cuantificar la heterogeneidad, usando modelos aleatorios cuando detectamos heterogeneidad ( $I^2 > 50\%$ ) y modelos fijos cuando no ( $I^2 \leq 50\%$ ) (Higgins, 2003).

Tanto los modelos de regresión como el metaanálisis se calcularon para los tres períodos de embarazo: periconcepcional, segundo periodo y ambos; así como estratificados por niño y niña.

En la Tabla 3 se muestra un resumen de los modelos de regresión empleados para explorar las asociaciones entre el uso de sAF (variable independiente) y la función cognitiva (variable dependiente, *outcome*).

**Tabla 3.** Modelos de regresión usados con cada variable.

<b>Artículo 1: The Use of Lower or Higher Than Recommended Doses of Folic Acid Supplements during Pregnancy Is Associated with Child Attentional Dysfunction at 4–5 Years of Age in the INMA Project</b>	
Regresión lineal robusta	Variables función atencional (HRT, HRT(SE), detectabilidad)
Regresión binomial negativa	Variables función atencional (errores por omisión y errores por comisión)
<b>Artículo 2: Association between the Use of Folic Acid Supplements during Pregnancy and Children's Cognitive Function at 7-9 Years of Age in the INMA Cohort Study</b>	
Regresión lineal robusta	Variables función atencional (HRT(SE), alerta, ejecutiva y orientación)
Regresión binomial negativa	Variables función atencional (errores por omisión y errores por comisión)
Regresión Tobit	Variables función atencional (detectabilidad) Variables memoria de trabajo (n-back 2, n-back 3)

### *Análisis de sensibilidad*

En los dos artículos realizamos análisis de sensibilidad, ajustando los modelos finales de regresión por variables que la literatura científica ha relacionado con efectos en la función cognitiva de los niños/as, con el fin de observar si se verían modificadas las asociaciones estadísticamente significativas encontradas entre nuestros resultados. En este sentido, incluimos en el modelo otras variables independientes como variables maternas como la ingesta de yodo a través de suplementos (<100, 100–149,  $\geq 150$   $\mu\text{g}/\text{día}$ ); el consumo de pescado durante el embarazo (gramos/día); el razonamiento verbal evaluado con la Escala de Inteligencia para Adultos de Wechsler-III (continuo); el momento de iniciar el uso de sAF (mes 0, mes 1–2, mes 3, no uso); la exposición al  $\text{NO}_2$  durante el embarazo ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ); el uso de paracetamol durante el embarazo (sí, no); el tiempo de lactancia materna (no, <20 semanas, >20 semanas; esta variable solo se exploró en el segundo artículo a petición de un revisor). En relación a los niños/as, incluimos variables como la ingesta de folato ( $\mu\text{g}/\text{día}$  ajustado por la ingesta energética en kilocalorías) evaluado por CFAs específicos y validados en cada rango de edad, a los 4-5 (Vioque et al., 2016) y 7-9 años (Vioque et al., 2019).

Además de valorar los cambios en los modelos de regresión ajustando por posibles variables influyentes, para evitar cualquier influencia potencial en la asociación, exploramos los modelos excluyendo a los sujetos con algunas condiciones que se han descrito en la literatura como asociadas al funcionamiento cognitivo infantil, como bebés prematuros, madres con condiciones médicas que podrían afectar al desarrollo típico de las funciones cognitivas (diabetes mellitus, epilepsia o enfermedad tiroidea), madres que no utilizaron sAF a lo largo de todo el embarazo, niños/as que cumplían los criterios de obesidad de la OMS ( $\geq$ percentil 97), niños/as con retraso psicomotor en las Escalas Bayley de Desarrollo Infantil (BSID) a la edad de 1 año (<percentil 85), niños/as con puntuaciones bajas en la función ejecutiva en las Escalas McCarthy de Habilidades Infantiles (MSCA) (<76.3), y por último, en el segundo artículo también se exploró la exclusión de los niños/as que a los 4-5 años de edad presentaron inatención según el test K-CPT.

## RESULTADOS PRINCIPALES

---

Los resultados de esta tesis doctoral se publicaron en dos artículos científicos en revistas indexadas en el primer (Anexo 2) y segundo cuartil (Anexo 3). De forma resumida, los resultados principales de cada publicación fueron:

### **Artículo 1: The Use of Lower or Higher Than Recommended Doses of Folic Acid Supplements during Pregnancy Is Associated with Child Attentional Dysfunction at 4–5 Years of Age in the INMA Project.**

La mediana de edad de las madres fue de 31 años y la mediana de edad de los niños/as en el momento de la evaluación cognitiva fue de 4.6 años. Durante el período periconcepcional, el 55.8% de las madres usaron dosis de <400 µg/día de sAF y el 29.2% de ≥1000 µg/día. Durante el segundo período de embarazo, los porcentajes disminuyeron al 51.4 en el uso de <400 µg/día de sAF y al 18.1 en el uso de ≥1000 µg/día.

En el período periconcepcional, en comparación al uso recomendado de sAF (400-999 µg/día), el uso de <400 µg/día y ≥1000 µg/día se asoció con un 14% (IRR = 1.14; IC 95% = 1.01; 1.29) y un 16% (IRR = 1.16; IC 95% = 1.02; 1.33) de aumento en el número de errores de omisión (indicador de inatención) de los niños/as, respectivamente. En otras palabras, los hijos/as de madres que usaron dosis periconcepcionales de sAF altas y bajas, tuvieron una mayor inatención a los 4-5 años de edad medida con el test K-CPT. No encontramos otras asociaciones estadísticamente significativas con el resto de variables del test K-CPT ni en otros períodos del embarazo.

Cuando exploramos estos resultados diferenciando por niño y niña, los efectos perjudiciales solo se mantuvieron en los niños. En concreto, el uso periconcepcional de <400 µg/día de sAF se asoció a un mayor número de errores de omisión (IRR = 1.22; IC 95% = 1.01; 1.47) y un mayor tiempo de respuesta (HRT) ( $\beta$  = 34.36; IC 95% = 10.01; 58.71). Además, el uso periconcepcional de ≥1000 µg/día de sAF se asoció también a un HRT ( $\beta$  = 33.18; IC 95% = 6.10; 60.25) y un mayor HRT(SE) ( $\beta$  = 3.31; IC 95% = 0.53; 6.09), es decir, una menor atención sostenida. En las niñas, sólo se observó una asociación protectora marginalmente significativa entre el uso de <400 µg/día de sAF durante el segundo período del embarazo y el número de errores de omisión (IRR = 0.86; IC 95% = 0.74; 1.00).

Los análisis de sensibilidad incluyendo a todos los niños/as y explorando las asociaciones entre el uso de <400 µg/día de sAF durante el período periconcepcional y el número de errores por omisión, se mantuvieron similares al modelo basal (IRR = 1.14; IC 95% = 1.01; 1.29), aunque se observó una asociación más fuerte cuando se ajustó por la ingesta dietética de folato y energía del niño/a (IRR = 1.17; IC 95% = 1.03; 1.32) y cuando se excluyeron las madres con condiciones médicas (IRR = 1.19; IC 95% = 1.04; 1.37). Además, la asociación entre el uso de ≥1000 µg/día de sAF y los errores por omisión (IRR = 1.16; IC 95% = 1.02; 1.33) se hizo ligeramente más fuerte cuando excluimos a las madres con condiciones médicas (IRR = 1.20; IC 95% = 1.03; 1.39).



## Artículo 2: Association between the Use of Folic Acid Supplements during Pregnancy and Children's Cognitive Function at 7-9 Years of Age in the INMA Cohort Study

La mediana de edad de las madres fue de 31 años y la mediana de edad de los niños/as en el momento de la evaluación cognitiva fue de 7.7 años. Durante el período periconcepcional, el 54.3% de las madres usaron dosis de <400 µg/día de sAF y el 31.2% de ≥1000 µg/día. Durante el segundo período de embarazo, los porcentajes cambiaron al 56.4 en el uso de <400 µg/día de sAF y al 17.2 en el uso de ≥1000 µg/día.

En el segundo período de embarazo, en comparación con el uso de 400-999 µg/día de sAF, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el uso de <400 µg/día de sAF y la función atencional de los hijos/as, concretamente, una mayor puntuación de la red atencional alerta en los niños/as a la edad de 7-9 años ( $\beta = 18.70$ , IC 95% = 7.51; 29.89). En otras palabras, los hijos/as de madres que consumieron dosis de <400 µg/día de sAF durante el segundo periodo del embarazo fueron menos capaces de alcanzar y mantener un estado de alerta óptimo durante el test ANT. No se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre el uso de sAF en dosis altas y bajas durante otros períodos de embarazo y la función cognitiva (función atencional y memoria de trabajo) de los hijos/as.

Cuando exploramos los análisis estratificando por sexo (niño y niña), observamos un efecto perjudicial del uso materno de <400 µg/día de sAF, en comparación al uso de 400-999 µg/día, durante el segundo período de embarazo en la red atencional alerta de las niñas ( $\beta = 30.01$ , IC 95% = 12.96; 47.01), pero este efecto no fue estadísticamente significativo en los niños ( $\beta = 12.05$ , IC 95% = -4.15; 28.25). En los niños, se observó una asociación significativa entre el uso de <400 µg/día de sAF y la memoria de trabajo. Específicamente, los niños cuyas madres usaron dosis de <400 µg/día en comparación con las que usaron 400-999 µg/día, rindieron peor en la tarea n-back 2 ( $\beta = -0.25$ , IC 95% = -0.49; 0.01). A lo largo del embarazo, observamos una asociación estadísticamente significativa entre el uso de ≥1000 µg/día de sAF, en comparación con el uso de 400-999 µg/día, y la función atencional de las niñas. Concretamente, las niñas cuyas madres usaban estas altas dosis, tenían una menor puntuación de HRT-SE ( $\beta = -20.38$ , IC 95% = -39.12; -1.63), lo que indica una mejor atención sostenida. Estas dosis altas de sAF también se asociaron con un mejor rendimiento de la memoria de trabajo en las niñas, tanto en n-back 2 como en n-back 3 ( $\beta = 0.28$ , IC 95% = 0.01; 0.56 y  $\beta = 0.32$ , IC 95% = 0.08; 0.56, respectivamente).















Los análisis de sensibilidad incluyendo a todos los niños/as y explorando las asociaciones entre el uso de <400 µg/día de sAF durante el segundo período de embarazo y la red atencional alerta se mantuvieron similares al modelo basal ( $\beta = 18.70$ , IC 95% = 7.51; 29.89). Observamos una asociación ligeramente más fuerte cuando ajustamos por algunas condiciones de las madres, como el inicio del uso de sAF ( $\beta = 19.71$ , IC 95% = 8.20; 31.22), el no uso de sAF en ningún periodo del embarazo ( $\beta = 20.11$ , IC 95% = 8.68; 31.54), y el razonamiento verbal ( $\beta = 19.45$ , IC 95% = 7.70; 31.19) y también cuando excluimos a las madres con condiciones médicas ( $\beta = 19.24$ , IC 95% = 7.03; 31.46). Por el contrario, la asociación se hizo ligeramente más débil cuando ajustamos por la ingesta de folato de los

niños/as a la edad de 7-9 años ( $\beta = 17.48$ ; IC 95% = 6.12; 28.84) y cuando excluimos a los niños/as con obesidad ( $\beta = 16.67$ ; IC 95% = 4.04; 29.31).

En la Figura 16 se muestra un esquema de los principales resultados encontrados en los dos artículos que conforman esta tesis doctoral.



**Figura 16.** Resumen gráfico de los resultados principales.

	4-5 años de edad	7-9 años de edad
<b>Periodo Periconcepcional</b>  <b>&lt; 400 µg/día de AF</b>	 Mayor inatención (IRR = 1.14; IC 95% = 1.01; 1.29)	No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas
	 Mayor inatención (IRR = 1.22; IC 95% = 1.01; 1.47) Mayor tiempo de respuesta ( $\beta$ = 34.36; IC 95% = 10.01; 58.71)	
<b>&gt;= 1000 µg/día de AF</b>	 No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas	No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas
	 Mayor inatención (IRR = 1.16; IC 95% = 1.02; 1.33)  Mayor tiempo de respuesta ( $\beta$ = 34.36; IC 95% = 10.01; 58.71) Menor atención sostenida ( $\beta$ = 3.31; IC 95% = 0.53; 6.09)	
<b>Segundo periodo de embarazo</b>  <b>&lt; 400 µg/día de AF</b>	 No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas	 Menor estado de alerta ( $\beta$ = 18.70; IC 95% = 7.51; 29.89)
	 Menor inatención (IRR = 0.86; IC 95% = 0.74; 1.00)	 Peor memoria de trabajo (n-back 2 $\beta$ = -0.25; IC 95% = -0.49; 0.01)
<b>&gt;= 1000 µg/día de AF</b>	 Menor inatención (IRR = 0.86; IC 95% = 0.74; 1.00)	 Menor estado de alerta ( $\beta$ = 30.01; IC 95% = 12.96; 47.01)
	No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas	No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas
<b>Ambos periodos</b>  <b>&lt; 400 µg/día de AF</b>	No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas	No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas
	No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas	 No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas   Mayor atención sostenida ( $\beta$ = -20.38; IC 95% = -39.12; -1.63) Mejor memoria de trabajo (n-back 2 $\beta$ = 0.28; IC 95% = 0.01; 0.56 y n-back 3 $\beta$ = 0.32; IC 95% = 0.08; 0.56)

**Fuente:** Elaboración propia

## DISCUSIÓN

---

Los resultados de esta tesis doctoral, sugieren, en primer lugar, que el uso de sAF en dosis más bajas que la recomendada (<400 µg/día) o más altas que el límite máximo tolerable (≥1000 µg/día), en comparación al uso recomendado, durante el período periconcepcional podrían producir alteraciones en la función cognitiva de los niños/as a los 4-5 años de edad, pero no a los 7-9 años. En concreto, los hijos e hijas de madres que se suplementaron tanto con dosis altas como con bajas durante el período periconcepcional, tuvieron una peor función atencional a los 4-5 años de edad, efectos que solo permanecieron evidentes en los hijos al realizar los análisis estratificados por sexo. En segundo lugar, sugieren que el uso de sAF en dosis bajas (<400 µg/día) durante el segundo período de embarazo (a partir del primer trimestre) podría producir alteraciones en la función cognitiva de los niños/as a los 7-9 años de edad, pero no a los 4-5 años. Concretamente, los hijos e hijas de madres que se suplementaron con dosis bajas, tuvieron una peor función atencional a los 7-9 años de edad. Tras realizar los análisis estratificados por sexo, los efectos negativos en la función atencional solo se mantuvieron en las hijas, mientras que en los hijos observamos una peor memoria de trabajo; contrariamente a los 4-5 años de edad se observa un efecto positivo en la función atencional de las niñas. En tercer lugar y de forma poco esperada, los resultados muestran que el uso alto de sAF (≥1000 µg/día) durante ambos períodos de embarazo podrían mejorar la función atencional y memoria de trabajo de las niñas a los 7-9 años de edad, aunque estos efectos no se observaron a los 4-5 años de edad.

Hay estudios que sugieren que el efecto de concentraciones de ácido fólico en sangre materna tanto bajas como altas podrían tener un efecto nocivo en el desarrollo temprano del cerebro debido a un mecanismo similar (Nijhout et al., 2004). El uso de sAF durante el embarazo por encima del límite máximo tolerable parece producir concentraciones de ácido fólico sin metabolizar en la sangre de la madre (Caffrey et al., 2019), que saturan los canales de transporte dependientes de este micronutriente presentes en la placenta y, por tanto, bloquean el paso de ácido fólico al feto (R. Zhao et al., 2011). En consecuencia, se produciría un déficit de ácido fólico en el feto, de la misma forma que ocurriría con el uso materno de sAF por debajo del recomendado durante el embarazo, efectos que podrían prevenirse con el uso recomendado de sAF (Pentieva et al., 2016). No obstante, los mecanismos por los que afectan las dosis bajas y altas de sAF durante el embarazo a la función cognitiva de los hijos/as, todavía no son claros.

Por otra parte, el uso de dosis altas o bajas de sAF puede influenciar la implicación del ácido fólico en los mecanismos epigenéticos durante el embarazo. Una nutrición materna inadecuada puede alterar los mecanismos epigenéticos del feto (Cai et al., 2021), lo que puede dar lugar a resultados adversos para la salud tras el nacimiento de los niños/as, como trastornos del neurodesarrollo (Li et al., 2019). El ácido fólico participa en una compleja vía denominada metabolismo de C<sub>1</sub>, que es responsable de proporcionar una serie de sustratos necesarios para los procesos epigenéticos fetales (Clare et al., 2021). Además, el metabolismo de C<sub>1</sub> parece controlar la población de células cerebrales del feto y la expresión epigenética del cerebro a través de la metilación del ADN (Clare et al., 2019). Por lo tanto, las alteraciones del metabolismo de C<sub>1</sub>, especialmente la deficiencia de folato, podrían estar asociadas

a trastornos del neurodesarrollo y a problemas conductuales y cognitivos en la infancia (Freedman et al., 2021; Mastrototaro et al., 2017). Sin embargo, el papel del metabolismo de C<sub>1</sub> en el desarrollo del cerebro y los efectos cognitivos a largo plazo siguen siendo en gran medida desconocidos.

En general, la evidencia científica que evalúa el uso de dosis altas y bajas de sAF durante el embarazo es muy escasa debido a compromisos éticos y morales. Por ello, hipótesis como las nuestras, generalmente sólo pueden ser evaluadas en estudios prospectivos de cohortes de nacimiento como el Proyecto INMA y/o en estudios con animales.

## Período periconcepcional

El uso de dosis recomendadas de sAF durante el período periconcepcional puede prevenir anomalías en el desarrollo del sistema nervioso central del feto, tales como los defectos del tubo neural (Liu et al., 2020), y además se relaciona con mejoras en el funcionamiento neurocognitivo en la infancia (Irwin et al., 2016). Por el contrario, el uso bajo de sAF durante este período de embarazo se ha asociado a un efecto perjudicial en el desarrollo mental a la edad de 1 año (del Río García et al., 2009), y el uso alto se ha asociado a retraso psicomotor a la edad de 1 año (Valera-Gran et al., 2014) y déficits verbales a la edad de 5 años (Valera-Gran et al., 2017). Estos efectos perjudiciales descritos en la literatura científica, provenientes de resultados tanto de estudios enmarcados en el Proyecto INMA, como de otros, nos hicieron establecer parte de las hipótesis de esta tesis doctoral, esperando encontrar un efecto perjudicial del uso no recomendado de sAF durante el período periconcepcional en la función cognitiva de los niños/as a los 4-5 y 7-9 años de edad.

Encontramos un efecto negativo del uso de sAF tanto en dosis bajas como en altas sobre la función cognitiva, específicamente en la función atencional, de los niños/as a los 4-5 años, aunque no fue observado a los 7-9 años de edad. Por un lado, el efecto perjudicial de las dosis bajas de sAF, podría en parte justificarse con el hecho de que los niveles deficientes de folato en sangre materna pueden afectar al desarrollo temprano del cerebro (Gao et al., 2016), y dar lugar a una peor función cognitiva de la descendencia (Veena et al., 2016). Otra posible justificación, son los resultados obtenidos en un estudio con animales, en el que se ha mostrado que las crías de ratón de madres alimentadas con una dieta deficiente en ácido fólico, tienen una mayor tasa de muerte celular de las neuronas, lo que podría afectar negativamente a su función cognitiva (Barua, Kuizon, et al., 2014).

Por otro lado, el efecto perjudicial en la función cognitiva de las dosis altas de sAF ha sido más estudiado que los efectos de las dosis bajas. En este sentido, Selhub and Rosenberg realizaron una revisión en la que mostraron efectos perjudiciales del uso alto de sAF no solo en la infancia, sino a lo largo de la vida (Selhub & Rosenberg, 2016). Estos efectos perjudiciales han sido confirmados en estudios con animales, y justificados con el hecho de que las dosis altas de sAF pueden derivar en ácido fólico sin metabolizar presente en el torrente sanguíneo de la madre, alterando la metilación de diferentes genes de la corteza frontal de la descendencia (Barua, Chadman, et al., 2014; Barua, Kuizon, et al., 2014), área clave para el correcto desarrollo de diversas funciones cognitivas. Por tanto, es

posible que las altas dosis de sAF durante el embarazo estén alterando la metilación de los genes que posteriormente se verán involucrados en el correcto desarrollo de la función atencional de los niños/as a los 4-5 años de edad.

Por último, no tenemos una explicación clara para la falta de asociación encontrada entre el uso de dosis bajas y altas de sAF durante este período de embarazo y la función cognitiva de los niños/as a los 7-9 años de edad. Teniendo en cuenta que se trata de la misma población de estudio, esperábamos encontrar un efecto similar del uso de sAF durante el período periconcepcional a los 4-5 y 7-9 años, aunque no ha sido así. Esta discrepancia podría deberse a la diferencia de edad de los niños/as en los dos estudios y, por tanto, a un nivel diferente de maduración cerebral y de desarrollo de la función cognitiva (Federico et al., 2017; Mullane et al., 2016; Rueda et al., 2004). Otra hipótesis alternativa puede ser que los déficits cognitivos observados a los 4-5 años se recuperan a los 7-9 años.

## Segundo período de embarazo

Nuestros resultados en este período de embarazo han mostrado que el uso bajo de sAF se asocia a un menor estado de alerta (peor función atencional) a los 7-9 años, pero no a los 4-5 años de edad. El uso de las dosis bajas y altas de sAF, y en general, el uso de sAF, tras el primer trimestre ha sido mucho menos estudiado debido a que las de su uso recomendaciones se centran en el período periconcepcional. Curiosamente, esto ha podido permitir cierto margen moral y ético para realizar ensayos clínicos aleatorizados con madres embarazadas y sAF, como el proyecto “Folic Acid Supplementation in the Second and Third Trimesters (FASSTT trial)” (B. McNulty et al., 2013). Lo que nos ha permitido comparar nuestros hallazgos con evidencia científica más sólida, procedente de un ensayo clínico y no sólo de estudios observacionales.

Hasta donde sabemos, este es el único ensayo clínico con el objetivo de explorar el uso de sAF tras el primer trimestre de embarazo. En el proyecto FASSTT, los investigadores reclutaron a 119 madres que habían usado 400 µg/día de sAF durante el período periconcepcional y las aleatorizaron en dos grupos antes del comienzo del segundo trimestre de embarazo: 1) placebo (no continuar usando sAF), 2) intervención (continuar usando 400 µg/día de sAF) (B. McNulty et al., 2013). Los resultados de este estudio mostraron que el uso de la dosis recomendada de sAF más allá del primer trimestre se asoció con un mejor razonamiento verbal a los 7 años de edad (H. McNulty et al., 2019) y mejor cognición a los 3 (H. McNulty et al., 2019) y 11 años de edad (Caffrey et al., 2021). Estos resultados son similares a los obtenidos por nuestra parte y a los obtenidos en un estudio observacional, en el que el uso bajo de sAF tras el primer trimestre se ha asociado con un menor volumen cerebral a los 6-8 años de edad y menores capacidades verbales y visoespaciales (Ars et al., 2019).

Los resultados beneficiosos del uso recomendado de sAF a partir del primer trimestre, así como el efecto perjudicial del uso bajo, pueden justificarse porque el segundo período del embarazo se caracteriza por el rápido crecimiento y mielinización del cerebro del feto, que son procesos

estrechamente relacionados con el funcionamiento cognitivo óptimo y son especialmente sensibles a la deficiencia de folato materno (Gilmore et al., 2018; Naninck et al., 2019; Roffman, 2018).

## Diferencias entre niños y niñas

Tanto a los 4-5 como a los 7-9 años de edad, hemos observado efectos diferentes del uso bajo y/o alto de sAF durante el embarazo en la función cognitiva de niños y niñas, sugiriendo, por tanto, un posible efecto dependiente del sexo de los hijos/as.

Durante el período periconcepcional, en comparación a los hijos de madres que usaron dosis recomendadas de sAF, nuestros resultados muestran que los hijos de madres que usaron dosis bajas o altas de sAF tuvieron una peor función atencional a los 4-5 años de edad. La evidencia al respecto es muy escasa, de hecho, no hemos encontrado otros estudios que hayan explorado los efectos del uso de sAF durante el embarazo en el desarrollo neuropsicológico en función del sexo del niño/a. Sin embargo, hemos encontrado evidencia de otros factores de exposición durante el embarazo que parecen tener distintos efectos en el desarrollo cognitivo de la descendencia, dependiendo del sexo del hijo/a. En el marco del Proyecto INMA se han encontrado diferencias según el sexo de los hijos/as en el desarrollo neuropsicológico a los 4-5 años de edad a causa de la exposición prenatal a contaminantes, siendo los niños más vulnerables a la exposición prenatal a partículas en suspensión menores de 2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y a dióxido de nitrógeno que las niñas (Lertxundi et al., 2019). Se encontró un resultado similar en la prueba KCP-T (evaluación de la función atencional) en los niños/as que participaron en el estudio *Health Outcomes and Measures of the Environment* (HOME) (Barnard et al., 2018) en el que las dificultades cognitivas sólo fueron evidentes en los niños a los 5 años de edad.

Los estudios del sistema nervioso usando tecnologías de imagen pueden ayudarnos a comprender la base neurológica de esta diferencia de sexo en los resultados de la función atencional. En este sentido, en un estudio publicado recientemente, se analizaron los cambios cerebrales relacionados con el sexo y la edad en los niños/as y mostró varias diferencias entre el desarrollo cerebral de los niños y las niñas, incluida una mayor conectividad en las áreas cerebrales relacionadas con la función atencional, concretamente el córtex orbitofrontal superior e izquierdo, en los niños que en las niñas (Wu et al., 2013). Además, estudios con técnicas de imagen realizadas en fetos humanos, han mostrado que estas diferencias en el neurodesarrollo surgen durante la gestación, incluida la conectividad neuronal de la CPF, área muy relacionada con la función atencional (Wheelock et al., 2019). Durante la gestación, las niñas mostraron un mayor rango de cambios en la conectividad funcional de la corteza prefrontal en comparación con los niños; además, esta conectividad disminuyó a medida que aumentaba la edad gestacional de forma más pronunciada en los niños (Wheelock et al., 2019). En consecuencia, es posible que los niños necesiten un mayor aporte de ácido fólico durante las primeras etapas de la gestación que las niñas porque es el momento en el que presentan una mayor conectividad neuronal, y por lo tanto podrían ser más sensibles a dosis bajas o altas de sAF periconcepcionales.

Durante el segundo período de embarazo, nuestros resultados mostraron que un bajo uso de sAF, en comparación al uso recomendado, se asociaba a un menor estado de alerta (función atencional) en las niñas y a una peor memoria de trabajo en los niños a los 7-9 años de edad. Por el contrario, observamos un efecto protector marginalmente significativo en la función atencional de las niñas a los 4-5 años de edad. Las discrepancias entre los resultados de ambos estudios podrían deberse a la diferencia de edad de los niños/as y, por tanto, a los distintos niveles de desarrollo de sus funciones cognitivas. La función atencional y la memoria de trabajo experimentan un importante desarrollo durante la primera infancia (Vuontela et al., 2013), especialmente a los 7-9 años de edad (Anderson, 2002; Vuontela et al., 2009). Esta edad se caracteriza por un pronunciado desarrollo del lóbulo frontal del cerebro (Rueda et al., 2004) que es una estructura clave para la memoria de trabajo y función atencional (Thomason et al., 2009). Concretamente, durante esta etapa, las niñas tienen un mejor rendimiento en tareas relacionadas con la memoria de trabajo (López-Vicente et al., 2016) y con la función atencional (Suades-González et al., 2017) que los niños, lo que sugiere que las niñas tienen una función cognitiva más desarrollada que los niños a la misma edad.

Hasta donde sabemos, ningún otro estudio previo ha analizado específicamente el efecto del uso materno de sAF tras el primer trimestre de embarazo sobre la atención y/o la memoria de trabajo de los niños/as. Aunque sí lo han hecho en relación a otras funciones cognitivas, como la función verbal, y han mostrado resultados en la misma dirección que los nuestros. Por ejemplo, Caffrey et al. (Caffrey et al., 2021) encontraron un efecto beneficioso del uso bajo de sAF más allá del primer trimestre sobre la comprensión verbal en las niñas a la edad de 11 años, pero no en los niños. Del mismo modo, un estudio observacional realizado en población india mostró que la asociación entre un estado adecuado de folato materno en el segundo trimestre de embarazo y la fluidez verbal era más fuerte en las niñas que en los niños a los 9-10 años de edad (Veena et al., 2010).

Como hemos indicado anteriormente, hay evidencia de que el neurodesarrollo y procesos relacionados e incluidos en él parecen diferir entre niños y niñas durante la gestación (Kaczurkin et al., 2019), lo que podría explicar que el uso de sAF en dosis bajas o altas durante el embarazo les afecte de forma distinta. A este respecto, un ensayo clínico aleatorizado ha mostrado que la metilación del ADN en genes relacionados con el desarrollo cerebral es distinta entre niños y niñas, y también, parece responder de forma distinta a las concentraciones de ácido fólico durante el segundo trimestre de embarazo (Caffrey et al., 2018). Además, la literatura científica sugiere que los patrones de actividad cerebral relacionados con la cognición y el desarrollo funcional del cerebro en la infancia, la niñez (Gilmore et al., 2018), e incluso en la adolescencia (Gignac et al., 2021) podrían ser diferentes en niños y niñas. Las niñas presentan una mayor tasa de mielinización que los niños en algunas estructuras cerebrales entre los 3 y los 60 meses, como el cuerpo caloso y la sustancia blanca frontal izquierda y temporal izquierda (Deoni et al., 2012). Entre los 7 y los 9 años de edad, se produce un rápido crecimiento en las conexiones del lóbulo frontal, área cerebral estrechamente relacionada con la memoria de trabajo y la función atencional (Anderson, 2002; Vuontela et al., 2009). Durante este período, parece haber un crecimiento cognitivo más pronunciado en las niñas (López-Vicente et al., 2016). En concreto, las niñas parecen experimentar picos de maduración de la memoria de trabajo más tempranos (Pelegrina et al., 2015; Vuontela et al., 2003) y una función atencional más avanzada



(Suades-González et al., 2017), que los niños; lo que podría sustentar una base biológica para las diferencias encontradas entre niños y niñas.

Por último, nuestros resultados mostraron que el uso de altas dosis de sAF a lo largo de ambos períodos de embarazo mejoró la atención sostenida y la memoria de trabajo de las niñas a los 7-9 años de edad. El uso elevado de sAF puede causar en la presencia de ácido fólico sin metabolizar en el torrente sanguíneo de la madre que puede saturar los mecanismos de conversión de ácido fólico en folato (Maruvada et al., 2020). pudiendo derivar en una menor absorción y participación del folato en los procesos de neurofisiológicos del feto. Por esta razón, esperábamos encontrar un efecto negativo del uso alto sAF durante el embarazo en la función cognitiva de los niños/as. No tenemos explicación para este hallazgo inesperado, aunque es cierto que la evidencia científica sobre el uso alto de sAF es inconclusa, pues se han documentado en la literatura tanto efectos beneficiosos como perjudiciales de su uso sobre la salud de la descendencia (Irvine et al., 2022; Silva et al., 2017). En este sentido, un ensayo clínico aleatorizado publicado recientemente indica que las dosis altas de sAF parecen no alterar el metabolismo de C<sub>1</sub> (Murphy et al., 2021) y, por tanto, podrían no influir en gran medida en el neurodesarrollo de la descendencia.

No es la primera vez que se describe en la literatura científica un efecto protector sobre la función cognitiva de los niños/as derivado de una exposición aparentemente dañina durante el embarazo. Un estudio multicéntrico de cohortes de nacimientos en seis países europeos ha asociado niveles prenatales de mercurio altos y el consumo materno de alcohol, dos exposiciones nocivas, durante el embarazo con un mejor rendimiento cognitivo en los niños/as a los 6-11 años de edad (Julvez et al., 2021). Del mismo modo, otro estudio ha mostrado que una mayor exposición prenatal a los organoclorados puede aumentar la función atencional en las niñas a la edad de 8 años (Sagiv et al., 2012).

Debemos tener en cuenta que todos los resultados inesperados, incluido el nuestro, pueden derivar de la causalidad inversa o la confusión residual, sesgos que no se pueden descartar en un estudio observacional como INMA. También por el hecho de que la dieta y otros factores relacionados al desarrollo cognitivo de los niños/as durante la infancia intervengan cambiando los déficits/riesgos observados a edades más tempranas.

## LIMITACIONES Y FORTALEZAS

Los estudios que componen esta tesis doctoral presentan ciertas limitaciones. En primer lugar, tienen un diseño observacional y, por tanto, existe el riesgo de confusión no controlada o residual. Teniendo en cuenta este sesgo, hemos ajustado los modelos de regresión por una amplia variedad de factores de riesgo potenciales y también hemos realizado análisis de sensibilidad, aunque es posible que hayamos pasado por alto alguna variable potencialmente confusora. Por ejemplo, no hemos tenido en cuenta como posible variable de confusión la variación entre los evaluadores, aunque todos ellos estaban entrenados para realizar las evaluaciones de la misma forma a través de protocolos estandarizados, por lo que las diferencias entre evaluadores deberían ser mínimas. En segundo lugar,

podría haber sesgo debido a la pérdida de seguimiento de algunos participantes. Sin embargo, las madres de los niños/as que realizaron la evaluación cognitiva tanto a los 4-5 como a los 7-9 años de edad, tenían una edad, un nivel educativo, un nivel socioeconómico y un uso de sAF muy similar, en comparación a las madres que fueron excluidas de los análisis por no haber realizado el seguimiento. En tercer lugar, nuestros resultados deben interpretarse con precaución porque no se observó interacción por sexo de los niños/as, realizamos los análisis estratificados justificándonos en que la evidencia científica existente había mostrado una tendencia específica por sexos ante distintas exposiciones maternas durante el embarazo. En cuarto lugar, el uso materno de sAF se calculó en base a respuestas autorreportadas, que tienden a ser muy declaradas en el caso de las conductas saludables y poco declaradas en el caso contrario. Además, las estimaciones basadas en respuestas pueden causar una clasificación errónea de los sujetos, aunque de hacerlo, el sesgo sería no diferencial. Para tratar de minimizar este sesgo, utilizamos un CFA validado previamente en esta población de mujeres embarazadas para clasificar a las madres según su uso de sAF (Vioque et al., 2013). En quinto lugar, nuestros resultados pueden ser poco generalizables a todos los países debido a las diferencias en las políticas de fortificación de los alimentos con ácido fólico, pues en España y mayoría de países de Europa los alimentos no están fortificados. Por último, nuestros resultados no explican los mecanismos neurofisiológicos que hacen que el uso de dosis altas o bajas de sAF durante el embarazo afecten a la función cognitiva en la infancia.

A pesar de las limitaciones, presentes en todos los estudios científicos, debemos destacar distintas fortalezas. En primer lugar, el diseño de cohorte prospectivo del proyecto INMA puede ayudar a minimizar el sesgo de recuerdo y selección, y aunque el tamaño de la muestra de ninguno de los dos artículos era muy grande, pudimos observar asociaciones estadísticamente significativas a partir de datos de cuatro cohortes INMA con protocolos comunes. En segundo lugar, utilizamos CFA validados para estimar la ingesta materna de sAF durante el embarazo, así como baterías estandarizadas e informatizadas para evaluar la función cognitiva de los niños/as, capaces de detectar pequeños cambios en las respuestas de los niños/as y proporcionar evaluaciones objetivas. En tercer lugar, la evaluación cognitiva fue realizada por entrevistadores entrenados y ajenos al estado de la exposición, lo que representa una evaluación más imparcial de las posibles asociaciones entre el uso materno de sAF y la función cognitiva en la infancia. En cuarto lugar, hemos mostrado información detallada sobre el uso de sAF en tres categorías de consumo y durante dos períodos distintos del embarazo, algo que muy pocos estudios publicados han realizado. En base a nuestro conocimiento, los dos artículos que componen esta tesis doctoral, son los únicos que han examinado el efecto del uso de alto y bajo de sAF en diferentes períodos del embarazo sobre la función atencional y la memoria de trabajo de los niños/as de población española. En quinto lugar, hemos realizado varios análisis de sensibilidad que han servido para reforzar la consistencia de los hallazgos encontrados. Por último, nuestros resultados incrementan la evidencia científica que sugiere la existencia de diferencias dependientes del sexo de la descendencia, específicamente sobre la función cognitiva, en relación con los efectos del uso alto y bajo de sAF durante el embarazo, abriendo nuevas líneas de investigación.

## CONCLUSIONES

---

Esta tesis doctoral basada en el estudio prospectivo de cohortes madre-hijo/a INMA muestra que:

1. El uso de la dosis recomendada de sAF tanto en el período periconcepcional, como en el segundo período de embarazo tiene un efecto beneficioso en la función cognitiva de los/as niños/as, específicamente en la función atencional a los 4-5 años; y en la función atencional y memoria de trabajo a los 7-9 años.
2. El uso de sAF en dosis bajas ( $<400 \mu\text{g/día}$ ) y altas ( $\geq 1000 \mu\text{g/día}$ ) en comparación con el uso de  $400\text{-}999 \mu\text{g/día}$  durante el período periconcepcional, puede tener efectos negativos en el desarrollo de la función atencional en niños/as de 4-5 años de edad.
3. El uso de sAF en dosis bajas ( $<400 \mu\text{g/día}$ ) y altas ( $\geq 1000 \mu\text{g/día}$ ) durante el período periconcepcional muestra efectos distintos en la función atencional de niñas y niños a los 4-5 años, alterándola particularmente en los niños.
4. El uso de sAF en dosis bajas ( $<400 \mu\text{g/día}$ ) y altas ( $\geq 1000 \mu\text{g/día}$ ) durante el período periconcepcional parece no tener efectos negativos en la función atencional ni memoria de trabajo de niños/as a los 7-9 años.
5. El uso de dosis bajas ( $400 \mu\text{g/día}$ ) de sAF tras el período periconcepcional parece tener un efecto diferente en niñas y niños a los 4-5 y 7-9 años de edad. En el caso de las niñas, puede mejorar la función atencional a los 4-5 años, aunque también puede reducir el estado de alerta a los 7-9 años. En el caso de los niños, no se han observado asociaciones significativas a los 4-5 años, pero sí una reducción de la memoria de trabajo a los 7-9 años.
6. El uso de dosis altas ( $\geq 1000 \mu\text{g/día}$ ) de sAF a lo largo del embarazo podría incrementar la memoria de trabajo y atención sostenida de las niñas a los 7-9 años.

## IMPLICACIONES EN SALUD PÚBLICA

---

El presente trabajo está compuesto por los datos del estudio INMA, cohorte de nacimiento de gran relevancia científica por la calidad de los datos, la información recogida y el largo período de seguimiento, lo que incrementa la fiabilidad de los resultados obtenidos y su relevancia desde el punto de vista de la Salud Pública.

Esta tesis ha sumado evidencia científica a un campo comprometido e importante como es el uso de sAF durante el embarazo y sus repercusiones en la función cognitiva de los niños/as a los 4-5 y 7-9 años. Actualmente, el efecto perjudicial del uso bajo y alto de sAF durante el período periconcepcional sobre la función cognitiva de los hijos/as es bastante evidente y apoyado por la literatura científica. No obstante, los artículos que han estudiado específicamente esta asociación en población española son aún escasos, siendo sus resultados novedosos.

Los resultados que hemos mostrado pueden contribuir a la actualización de las recomendaciones de uso de sAF durante el embarazo, especialmente tras el primer trimestre, período sobre el cuál no existen recomendaciones claras, aunque sí evidencia incipiente de su influencia en la función cognitiva de los hijos e hijas. En este sentido, un aspecto novedoso de esta tesis doctoral, es que ha mostrado que el uso de sAF en dosis altas o bajas durante un período de embarazo poco estudiado, como lo es el segundo trimestre, también podría tener consecuencias negativas en la función cognitiva de la descendencia, en este caso, en la función atencional y memoria de trabajo. Siendo, según nuestro conocimiento, la primera vez que se muestran estos resultados en población española.

Además, debemos destacar los hallazgos encontrados en cuanto a los diferentes efectos del uso alto y bajo de sAF durante el embarazo en niños y niñas. Los resultados estratificados por sexo, son muy raramente publicados en la literatura científica sobre exposiciones maternas durante el embarazo y la salud de la descendencia, y más en concreto, siendo la exposición el uso alto y bajo de sAF. En este sentido, esta tesis aporta una perspectiva de género en cuanto a los efectos del uso de dosis altas y bajas de sAF durante el embarazo en la función cognitiva en la infancia, mostrando una posible mayor vulnerabilidad de los niños frente a las niñas. Resultados que podría ser importante tener en cuenta a la hora de diseñar intervenciones y abordajes de la función cognitiva durante la infancia.

Teniendo en cuenta las implicaciones de las condiciones durante el embarazo en la salud de la descendencia, que pueden durar toda la vida (Calkins & Devaskar, 2011), es necesario comprender y satisfacer las demandas de salud de las mujeres durante todas las etapas del embarazo, asegurando que cualquier recomendación que se les aporte, esté científicamente validada y confirmada. Por ello, pretendemos continuar con esta línea de investigación, explorando el efecto del uso de sAF en la función cognitiva de los niños y niñas de forma longitudinal, entre los 4 y los 11 años de edad, para poder establecer una causalidad y confirmar los resultados de los dos trabajos que componen esta tesis doctoral. Además, seguiremos ahondando en el efecto del uso de dosis altas y bajas de sAF durante el embarazo sobre el neurodesarrollo, específicamente en relación al TEA y al TDAH, dos

trastornos con una alta prevalencia e impacto en el día a día de los niños y niñas que lo padecen, y también de sus familiares.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abduljalil, K., Furness, P., Johnson, T. N., Rostami-Hodjegan, A., & Soltani, H. (2012). Anatomical, Physiological and Metabolic Changes with Gestational Age during Normal Pregnancy: A Database for Parameters Required in Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling. *Clinical Pharmacokinetics*, 51(6), 365-396.  
<https://doi.org/10.2165/11597440-000000000-00000>
- Ahmed Sakran, K., Mutahar Abotaleb, B., Khaled Al-Rokhami, R., Hsieh, T., Al-Wesabi, M. A., Mohammed, A. A., Al-Sharani, H. M., Shi, P., & He, D. (2022). Analysis of Environmental Exposures for Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate: A Case-Control Study. *Iranian Journal of Public Health*. <https://doi.org/10.18502/ijph.v51i3.8934>
- Anderson, P. (2002). Assessment and Development of Executive Function (EF) During Childhood. *Child Neuropsychology*, 8(2), 71-82.  
<https://doi.org/10.1076/chin.8.2.71.8724>
- Antón, E., Duñabeitia, J. A., Estévez, A., Hernández, J. A., Castillo, A., Fuentes, L. J., Davidson, D. J., & Carreiras, M. (2014). Is there a bilingual advantage in the ANT task? Evidence from children. *Frontiers in Psychology*, 5, 398.  
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00398>
- Arija, V., Hernández-Martínez, C., Tous, M., Canals, J., Guxens, M., Fernández-Barrés, S., Ibarluzea, J., Babarro, I., Soler-Blasco, R., Llop, S., Vioque, J., Sunyer, J., & Julvez, J. (2019). Association of Iron Status and Intake During Pregnancy with Neuropsychological Outcomes in Children Aged 7 Years: The Prospective Birth Cohort Infancia y Medio Ambiente (INMA) Study. *Nutrients*, 11(12), 2999.  
<https://doi.org/10.3390/nu11122999>
- Ars, C. L., Nijs, I. M., Marroun, H. E., Muetzel, R., Schmidt, M., Steenweg-de Graaff, J., van der Lugt, A., Jaddoe, V. W., Hofman, A., Steegers, E. A., Verhulst, F. C., Tiemeier, H., & White, T. (2019). Prenatal folate, homocysteine and vitamin B12 levels and child brain volumes, cognitive development and psychological functioning: The Generation R Study. *The British Journal of Nutrition*, 122(s1), S1-S9.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114515002081>

- Avram, C., Bucur, O. M., Zazgyva, A., Avram, L., & Ruta, F. (2022). Vitamin Supplementation in Pre-Pregnancy and Pregnancy among Women—Effects and Influencing Factors in Romania. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(14), 8503. <https://doi.org/10.3390/ijerph19148503>
- Bahous, R. H., Jadavji, N. M., Deng, L., Cosín-Tomás, M., Lu, J., Malysheva, O., Leung, K.-Y., Ho, M.-K., Pallàs, M., Kaliman, P., Greene, N. DE., Bedell, B. J., Caudill, M. A., & Rozen, R. (2017). High dietary folate in pregnant mice leads to pseudo-MTHFR deficiency and altered methyl metabolism, with embryonic growth delay and short-term memory impairment in offspring. *Human Molecular Genetics*, ddx004. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx004>
- Bailey, L. B., Stover, P. J., McNulty, H., Fenech, M. F., Gregory, J. F., Mills, J. L., Pfeiffer, C. M., Fazili, Z., Zhang, M., Ueland, P. M., Molloy, A. M., Caudill, M. A., Shane, B., Berry, R. J., Bailey, R. L., Hausman, D. B., Raghavan, R., & Raiten, D. J. (2015). Biomarkers of Nutrition for Development-Folate Review. *The Journal of Nutrition*, *145*(7), 1636S-1680S. <https://doi.org/10.3945/jn.114.206599>
- Barker, D. J. P. (2007). The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine*, *261*(5), 412-417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x>
- Barnard, H., Rao, R., Xu, Y., Froehlich, T., Epstein, J., Lanphear, B. P., & Yolton, K. (2018). Association of the Conners' Kiddie Continuous Performance Test (K-CPT) Performance and Parent-Report Measures of Behavior and Executive Functioning. *Journal of Attention Disorders*, *22*(11), 1056-1065. <https://doi.org/10.1177/1087054715578271>
- Barrero-Castillero, A., Morton, S. U., Nelson, C. A., & Smith, V. C. (2019). Psychosocial Stress and Adversity: Effects from the Perinatal Period to Adulthood. *NeoReviews*, *20*(12), e686-e696. <https://doi.org/10.1542/neo.20-12-e686>
- Barua, S., Chadman, K. K., Kuizon, S., Buenaventura, D., Stapley, N. W., Ruocco, F., Begum, U., Guariglia, S. R., Brown, W. T., & Junaid, M. A. (2014). Increasing Maternal or Post-Weaning Folic Acid Alters Gene Expression and Moderately Changes Behavior in the Offspring. *PLoS ONE*, *9*(7), e101674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101674>
- Barua, S., Kuizon, S., Chadman, K. K., Flory, M. J., Brown, W. T., & Junaid, M. A. (2014). Single-base resolution of mouse offspring brain methylome reveals epigenome

- modifications caused by gestational folic acid. *Epigenetics & Chromatin*, 7(1), 3.  
<https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-3>
- Belfort, M. B., Anderson, P. J., Nowak, V. A., Lee, K. J., Molesworth, C., Thompson, D. K., Doyle, L. W., & Inder, T. E. (2016). Breast Milk Feeding, Brain Development, and Neurocognitive Outcomes: A 7-Year Longitudinal Study in Infants Born at Less Than 30 Weeks' Gestation. *The Journal of Pediatrics*, 177, 133-139.e1.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.06.045>
- Bishop & Rutter. (2008). *Neurodevelopmental disorders: Conceptual approaches*. Blackwell.
- Blumfield, M. L., Hure, A. J., Macdonald-Wicks, L., Smith, R., & Collins, C. E. (2013). A systematic review and meta-analysis of micronutrient intakes during pregnancy in developed countries. *Nutrition Reviews*, 71(2), 118-132.  
<https://doi.org/10.1111/nure.12003>
- Boyd, A., Golding, J., Macleod, J., Lawlor, D. A., Fraser, A., Henderson, J., Molloy, L., Ness, A., Ring, S., & Davey Smith, G. (2013). Cohort Profile: The 'Children of the 90s'—the index offspring of the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *International Journal of Epidemiology*, 42(1), 111-127. <https://doi.org/10.1093/ije/dys064>
- Breton, C. V., Marsit, C. J., Faustman, E., Nadeau, K., Goodrich, J. M., Dolinoy, D. C., Herbstman, J., Holland, N., LaSalle, J. M., Schmidt, R., Yousefi, P., Perera, F., Joubert, B. R., Wiemels, J., Taylor, M., Yang, I. V., Chen, R., Hew, K. M., Freeland, D. M. H., ... Murphy, S. K. (2017). Small-Magnitude Effect Sizes in Epigenetic End Points are Important in Children's Environmental Health Studies: The Children's Environmental Health and Disease Prevention Research Center's Epigenetics Working Group. *Environmental Health Perspectives*, 125(4), 511-526. <https://doi.org/10.1289/EHP595>
- Brito, A., Hertrampf, E., Olivares, M., Gaitán, D., Sánchez, H., Allen, L. H., & Uauy, R. (2012). Folatos y vitamina B12 en la salud humana. *Revista Médica de Chile*, 140(11), 1464-1475. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872012001100014>
- Brown, B., & Wright, C. (2020). Safety and efficacy of supplements in pregnancy. *Nutrition Reviews*, 78(10), 813-826. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz101>
- Caffrey, A., Irwin, R. E., McNulty, H., Strain, J. J., Lees-Murdock, D. J., McNulty, B. A., Ward, M., Walsh, C. P., & Pentieva, K. (2018). Gene-specific DNA methylation in newborns in



- response to folic acid supplementation during the second and third trimesters of pregnancy: Epigenetic analysis from a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 107(4), 566-575. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqx069>
- Caffrey, A., McNulty, H., Irwin, R. E., Walsh, C. P., & Pentieva, K. (2019). Maternal folate nutrition and offspring health: Evidence and current controversies. *Proceedings of the Nutrition Society*, 78(02), 208-220. <https://doi.org/10.1017/S0029665118002689>
- Caffrey, A., McNulty, H., Rollins, M., Prasad, G., Gaur, P., Talcott, J. B., Witton, C., Cassidy, T., Marshall, B., Dornan, J., Moore, A. J., Ward, M., Strain, J. J., Molloy, A. M., McLaughlin, M., Lees-Murdock, D. J., Walsh, C. P., & Pentieva, K. (2021). Effects of maternal folic acid supplementation during the second and third trimesters of pregnancy on neurocognitive development in the child: An 11-year follow-up from a randomised controlled trial. *BMC Medicine*, 19(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12916-021-01914-9>
- Cai, S., Quan, S., Yang, G., Chen, M., Ye, Q., Wang, G., Yu, H., Wang, Y., Qiao, S., & Zeng, X. (2021). Nutritional Status Impacts Epigenetic Regulation in Early Embryo Development: A Scoping Review. *Advances in Nutrition*, 12(5), 1877-1892. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab038>
- Calkins, K., & Devaskar, S. U. (2011). Fetal Origins of Adult Disease. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 41(6), 158-176. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2011.01.001>
- Caudill, M. A. (2010). Folate bioavailability: Implications for establishing dietary recommendations and optimizing status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1455S-1460S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674E>
- Centers for Disease Control (CDC). (1991). Use of folic acid for prevention of spina bifida and other neural tube defects—1983-1991. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 40(30), 513-516.
- Centre for Educational Research and Innovation, & Organisation for Economic Co-operation and Development (Eds.). (2007). *Understanding the brain: The birth of a learning science*. OECD.
- Chatzi, L., Papadopoulou, E., Koutra, K., Roumeliotaki, T., Georgiou, V., Stratakis, N., Lebentakou, V., Karachaliou, M., Vassilaki, M., & Kogevinas, M. (2012). Effect of high

- doses of folic acid supplementation in early pregnancy on child neurodevelopment at 18 months of age: The mother-child cohort «Rhea» study in Crete, Greece. *Public Health Nutrition*, 15(9), 1728-1736. <https://doi.org/10.1017/S1368980012000067>
- Cheatham, C. L. (2019). Nutritional Factors in Fetal and Infant Brain Development. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 75(Suppl. 1), 20-32. <https://doi.org/10.1159/000508052>
- Chen, H., Qin, L., Gao, R., Jin, X., Cheng, K., Zhang, S., Hu, X., Xu, W., & Wang, H. (2021). Neurodevelopmental effects of maternal folic acid supplementation: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1993781>
- Chen, L.-W., Aubert, A. M., Shivappa, N., Bernard, J. Y., Mensink-Bout, S. M., Geraghty, A. A., Mehegan, J., Suderman, M., Polanska, K., Hanke, W., Trafalska, E., Relton, C. L., Crozier, S. R., Harvey, N. C., Cooper, C., Duijts, L., Heude, B., Hébert, J. R., McAuliffe, F. M., ... Phillips, C. M. (2021). Associations of maternal dietary inflammatory potential and quality with offspring birth outcomes: An individual participant data pooled analysis of 7 European cohorts in the ALPHABET consortium. *PLOS Medicine*, 18(1), e1003491. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003491>
- Clare, C. E., Brassington, A. H., Kwong, W. Y., & Sinclair, K. D. (2019). One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development. *Annual Review of Animal Biosciences*, 7(1), 263-287. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115206>
- Clare, C. E., Pestinger, V., Kwong, W. Y., Tutt, D. A. R., Xu, J., Byrne, H. M., Barrett, D. A., Emes, R. D., & Sinclair, K. D. (2021). Interspecific Variation in One-Carbon Metabolism within the Ovarian Follicle, Oocyte, and Preimplantation Embryo: Consequences for Epigenetic Programming of DNA Methylation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1838. <https://doi.org/10.3390/ijms22041838>
- Clark, D. L., Boutros, N. N., & Mendez, M. F. (2017). *The brain and behavior: An introduction to behavioral neuroanatomy* (Fourth edition). Cambridge University Press.
- Cohen, J. F. W., Rifas-Shiman, S. L., Young, J., & Oken, E. (2018). Associations of Prenatal and Child Sugar Intake With Child Cognition. *American Journal of Preventive Medicine*, 54(6), 727-735. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2018.02.020>

- Conners, C., & Staff, M. (2000). *Conners' Continuous Performance Test II: Computer Program for Windows Technical Guide and Software Manual*. Mutli-Health Systems.
- Conners, C., & Staff, M. (2001). *Conners' Kiddie Continuous Performance Test (K-CPT): Computer Program for Windows Technical Guide and Software Manual*. Multi-Health Systems, Inc.
- Cormack, B. E., Harding, J. E., Miller, S. P., & Bloomfield, F. H. (2019). The Influence of Early Nutrition on Brain Growth and Neurodevelopment in Extremely Preterm Babies: A Narrative Review. *Nutrients*, *11*(9), 2029. <https://doi.org/10.3390/nu11092029>
- Curtin, M., Baker, D., Staines, A., & Perry, I. J. (2014). Are the special educational needs of children in their first year in primary school in Ireland being identified: A cross-sectional study. *BMC Pediatrics*, *14*(1), 52. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-14-52>
- Cusick, S. E., & Georgieff, M. K. (2016). The Role of Nutrition in Brain Development: The Golden Opportunity of the "First 1000 Days". *The Journal of Pediatrics*, *175*, 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.05.013>
- Cuskelly, G. J., McNulty, H., & Scott, J. M. (1996). Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: Implications for prevention of neural tube defects. *The Lancet*, *347*(9002), 657-659. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)91205-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)91205-2)
- Czeizel, A. E. (2009). Periconceptional folic acid and multivitamin supplementation for the prevention of neural tube defects and other congenital abnormalities. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, *85*(4), 260-268. <https://doi.org/10.1002/bdra.20563>
- Czeizel, A. E., & Dudás, I. (1992). Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *The New England Journal of Medicine*, *327*(26), 1832-1835. <https://doi.org/10.1056/NEJM199212243272602>
- del Río Garcia, C., Torres-Sánchez, L., Chen, J., Schnaas, L., Hernández, C., Osorio, E., Portillo, M. G., & López-Carrillo, L. (2009). Maternal *MTHFR* 677C>T genotype and dietary intake of folate and vitamin B<sub>12</sub>: Their impact on child neurodevelopment. *Nutritional Neuroscience*, *12*(1), 13-20. <https://doi.org/10.1179/147683009X388913>
- de Lauzon-Guillain, B., Marques, C., Kadawathagedara, M., Bernard, J. Y., Tafflet, M., Lioret, S., & Charles, M. A. (2022). Maternal diet during pregnancy and child

- neurodevelopment up to age 3.5 years: The nationwide Étude Longitudinale Française depuis l'Enfance (ELFE) birth cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 116(4), 1101-1111. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqac206>
- Deoni, S. C. L., Dean, D. C., O'Muircheartaigh, J., Dirks, H., & Jerskey, B. A. (2012). Investigating white matter development in infancy and early childhood using myelin water fraction and relaxation time mapping. *NeuroImage*, 63(3), 1038-1053. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.07.037>
- Desai, A., Sequeira, J. M., & Quadros, E. V. (2016). The metabolic basis for developmental disorders due to defective folate transport. *Biochimie*, 126, 31-42. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.02.012>
- Deserno, L., Sterzer, P., Wustenberg, T., Heinz, A., & Schlagenhauf, F. (2012). Reduced Prefrontal-Parietal Effective Connectivity and Working Memory Deficits in Schizophrenia. *Journal of Neuroscience*, 32(1), 12-20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3405-11.2012>
- Diamond, A. (2002). Normal Development of Prefrontal Cortex from Birth to Young Adulthood: Cognitive Functions, Anatomy, and Biochemistry. En D. T. Stuss & R. T. Knight (Eds.), *Principles of Frontal Lobe Function* (pp. 466-503). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195134971.003.0029>
- D'Souza, S., Waldie, K. E., Peterson, E. R., Underwood, L., & Morton, S. M. B. (2019). Antenatal and Postnatal Determinants of Behavioural Difficulties in Early Childhood: Evidence from Growing Up in New Zealand. *Child Psychiatry and Human Development*, 50(1), 45-60. <https://doi.org/10.1007/s10578-018-0816-6>
- Federico, F., Marotta, A., Martella, D., & Casagrande, M. (2017). Development in attention functions and social processing: Evidence from the Attention Network Test. *British Journal of Developmental Psychology*, 35(2), 169-185. <https://doi.org/10.1111/bjdp.12154>
- Fernández-Barrés, S., Romaguera, D., Valvi, D., Martínez, D., Vioque, J., Navarrete-Muñoz, E. M., Amiano, P., Gonzalez-Palacios, S., Guxens, M., Pereda, E., Riaño, I., Tardón, A., Iñiguez, C., Arija, V., Sunyer, J., Vrijheid, M., & on behalf of the INMA Project. (2016). Mediterranean dietary pattern in pregnant women and offspring risk of overweight and

- abdominal obesity in early childhood: The INMA birth cohort study: Maternal diet and childhood obesity. *Pediatric Obesity*, 11(6), 491-499. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12092>
- Fernández-Barrés, S., Vrijheid, M., Manzano-Salgado, C. B., Valvi, D., Martínez, D., Iñiguez, C., Jimenez-Zabala, A., Riaño-Galán, I., Navarrete-Muñoz, E. M., Santa-Marina, L., Tardón, A., Vioque, J., Arija, V., Sunyer, J., & Romaguera, D. (2019). The Association of Mediterranean Diet during Pregnancy with Longitudinal Body Mass Index Trajectories and Cardiometabolic Risk in Early Childhood. *The Journal of Pediatrics*, 206, 119-127.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.10.005>
- Flores-Lázaro, J., & Ostrosky-Solís, F. (2012). *Desarrollo neuropsicológico de lóbulos frontales y funciones ejecutivas* (1.ª ed.). El Manual Moderno.
- Food Fortification Initiative. (2022). Mandatory Cereal Grain Fortification Legislation—July 2022 [Oficial]. *Food Fortification Initiative*. <https://www.ffinetwork.org/globalprogress>
- Forns, J., Aranbarri, A., Grellier, J., Julvez, J., Vrijheid, M., & Sunyer, J. (2012). A Conceptual Framework in the Study of Neuropsychological Development in Epidemiological Studies. *Neuroepidemiology*, 38(4), 203-208. <https://doi.org/10.1159/000337169>
- Forns, J., Esnaola, M., López-Vicente, M., Suades-González, E., Alvarez-Pedrerol, M., Julvez, J., Grellier, J., Sebastián-Gallés, N., & Sunyer, J. (2014). The n-back Test and the Attentional Network Task as measures of child neuropsychological development in epidemiological studies. *Neuropsychology*, 28(4), 519-529. <https://doi.org/10.1037/neu0000085>
- Freedman, R., Hunter, S. K., Law, A. J., Clark, A. M., Roberts, A., & Hoffman, M. C. (2021). Choline, folic acid, Vitamin D, and fetal brain development in the psychosis spectrum. *Schizophrenia Research*, S0920-9964(21)00128-6. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2021.03.008>
- Freitas-Vilela, A. A., Pearson, R. M., Emmett, P., Heron, J., Smith, A. D. A. C., Emond, A., Hibbeln, J. R., Castro, M. B. T., & Kac, G. (2018). Maternal dietary patterns during pregnancy and intelligence quotients in the offspring at 8 years of age: Findings from the ALSPAC cohort. *Maternal & Child Nutrition*, 14(1), e12431. <https://doi.org/10.1111/mcn.12431>

- Gao, Y., Sheng, C., Xie, R., Sun, W., Asztalos, E., Moddemann, D., Zwaigenbaum, L., Walker, M., & Wen, S. W. (2016). New Perspective on Impact of Folic Acid Supplementation during Pregnancy on Neurodevelopment/Autism in the Offspring Children – A Systematic Review. *PLOS ONE*, *11*(11), e0165626.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165626>
- Gascon, M., Guxens, M., Vrijheid, M., Torrent, M., Ibarluzea, J., Fano, E., Llop, S., Ballester, F., Fernández, M. F., Tardón, A., Fernández-Somoano, A., & Sunyer, J. (2017). The INMA—INfancia y Medio Ambiente—(Environment and Childhood) project: More than 10 years contributing to environmental and neuropsychological research. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *220*(4), 647-658.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.02.008>
- Gatenby, P. B. B., & Lillie, E. W. (1960). Clinical Analysis of 100 Cases of Severe Megaloblastic Anaemia of Pregnancy. *BMJ*, *2*(5206), 1111-1114.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.2.5206.1111>
- Georgieff, M. K., Ramel, S. E., & Cusick, S. E. (2018). Nutritional influences on brain development. *Acta Paediatrica*, *107*(8), 1310-1321. <https://doi.org/10.1111/apa.14287>
- Gignac, F., Solé, C., Barrera-Gómez, J., Persavento, C., Tena, È., López-Vicente, M., Júlvez, J., Sunyer, J., Couso, D., & Basagaña, X. (2021). Identifying Factors Influencing Attention in Adolescents with a Co-Created Questionnaire: A Citizen Science Approach with Secondary Students in Barcelona, Spain. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(15), 8221. <https://doi.org/10.3390/ijerph18158221>
- Gilmore, J. H., Knickmeyer, R. C., & Gao, W. (2018). Imaging structural and functional brain development in early childhood. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(3), 123-137.  
<https://doi.org/10.1038/nrn.2018.1>
- Godfrey, K. M., & Barker, D. J. (2001). Fetal programming and adult health. *Public Health Nutrition*, *4*(2b), 611-624. <https://doi.org/10.1079/PHN2001145>
- Greenberg, J. A., Bell, S. J., Guan, Y., & Yu, Y.-H. (2011). Folic Acid supplementation and pregnancy: More than just neural tube defect prevention. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*, *4*(2), 52-59.

- Guxens, M., Ballester, F., Espada, M., Fernández, M. F., Grimalt, J. O., Ibarluzea, J., Olea, N., Rebagliato, M., Tardón, A., Torrent, M., Vioque, J., Vrijheid, M., Sunyer, J., & INMA Project. (2012). Cohort Profile: The INMA--Infancia y Medio Ambiente--(Environment and Childhood) Project. *International Journal of Epidemiology*, *41*(4), 930-940.  
<https://doi.org/10.1093/ije/dyr054>
- Hall, J. E. (2020). *Guyton and hall textbook of medical physiology* (14.<sup>a</sup> ed.). Elsevier.
- Hanson, M. A., & Gluckman, P. D. (2008). Developmental Origins of Health and Disease: New Insights: DEVELOPMENTAL ORIGINS OF HEALTH AND DISEASE: NEW INSIGHTS. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *102*(2), 90-93.  
<https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00186.x>
- Harding, J. E., Cormack, B. E., Alexander, T., Alsweiler, J. M., & Bloomfield, F. H. (2017). Advances in nutrition of the newborn infant. *The Lancet*, *389*(10079), 1660-1668.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30552-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30552-4)
- Haytowitz, D. B., & Pehrsson, P. R. (2018). USDA's National Food and Nutrient Analysis Program (NFNAP) produces high-quality data for USDA food composition databases: Two decades of collaboration. *Food Chemistry*, *238*, 134-138.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.082>
- Higgins, J. P. T. (2003). Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ*, *327*(7414), 557-560.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.327.7414.557>
- Hüppi, P. S., Warfield, S., Kikinis, R., Barnes, P. D., Zientara, G. P., Jolesz, F. A., Tsuji, M. K., & Volpe, J. J. (1998). Quantitative magnetic resonance imaging of brain development in premature and mature newborns: Brain MRI in Newborns. *Annals of Neurology*, *43*(2), 224-235. <https://doi.org/10.1002/ana.410430213>
- Institute of Medicine (US). (1998). *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline* (p. 6015). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/6015>
- Irvine, N., England-Mason, G., Field, C. J., Dewey, D., & Aghajafari, F. (2022). Prenatal Folate and Choline Levels and Brain and Cognitive Development in Children: A Critical Narrative Review. *Nutrients*, *14*(2), 364. <https://doi.org/10.3390/nu14020364>

- Irwin, R. E., Pentieva, K., Cassidy, T., Lees-Murdock, D. J., McLaughlin, M., Prasad, G., McNulty, H., & Walsh, C. P. (2016). The interplay between DNA methylation, folate and neurocognitive development. *Epigenomics*, 8(6), 863-879. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0003>
- Jankovic-Karasoulos, T., Furness, D. L., Leemaqz, S. Y., Dekker, G. A., Grzeskowiak, L. E., Grieger, J. A., Andraweera, P. H., McCullough, D., McAninch, D., McCowan, L. M., Bianco-Miotto, T., & Roberts, C. T. (2021). Maternal folate, one-carbon metabolism and pregnancy outcomes. *Maternal & Child Nutrition*, 17(1). <https://doi.org/10.1111/mcn.13064>
- Jayarajan, R., Natarajan, A., & Nagamuttu, R. (2019). Efficacy of Periconceptional High-Dose Folic Acid in Isolated Orofacial Cleft Prevention: A Systematic Review. *Indian Journal of Plastic Surgery*, 52(02), 153-159. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1696864>
- Jeste, S. S. (2015). Neurodevelopmental Behavioral and Cognitive Disorders: *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 21, 690-714. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000466661.89908.3c>
- Jouanne, M., Oddoux, S., Noël, A., & Voisin-Chiret, A. S. (2021). Nutrient Requirements during Pregnancy and Lactation. *Nutrients*, 13(2), 692. <https://doi.org/10.3390/nu13020692>
- Julvez, J., Fernández-Barrés, S., Gignac, F., López-Vicente, M., Bustamante, M., Garcia-Esteban, R., Vioque, J., Llop, S., Ballester, F., Fernández-Somoano, A., Tardón, A., Vrijheid, M., Tonne, C., Ibarluzea, J., Irazabal, A., Sebastian-Galles, N., Burgaleta, M., Romaguera, D., & Sunyer, J. (2020). Maternal seafood consumption during pregnancy and child attention outcomes: A cohort study with gene effect modification by PUFA-related genes. *International Journal of Epidemiology*, 49(2), 559-571. <https://doi.org/10.1093/ije/dyz197>
- Julvez, J., López-Vicente, M., Warembourg, C., Maitre, L., Philippat, C., Gützkow, K. B., Guxens, M., Evandt, J., Andrusaityte, S., Burgaleta, M., Casas, M., Chatzi, L., de Castro, M., Donaire-González, D., Gražulevičienė, R., Hernandez-Ferrer, C., Heude, B., Mceachan, R., Mon-Williams, M., ... Vrijheid, M. (2021). Early life multiple exposures and child cognitive function: A multi-centric birth cohort study in six European countries.



*Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 284, 117404.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117404>

- Kaczurkin, A. N., Raznahan, A., & Satterthwaite, T. D. (2019). Sex differences in the developing brain: Insights from multimodal neuroimaging. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 44(1), 71-85. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0111-z>
- Kooijman, M. N., Kruithof, C. J., van Duijn, C. M., Duijts, L., Franco, O. H., van IJzendoorn, M. H., de Jongste, J. C., Klaver, C. C. W., van der Lugt, A., Mackenbach, J. P., Moll, H. A., Peeters, R. P., Raat, H., Rings, E. H. H. M., Rivadeneira, F., van der Schroeff, M. P., Steegers, E. A. P., Tiemeier, H., Uitterlinden, A. G., ... Jaddoe, V. W. V. (2016). The Generation R Study: Design and cohort update 2017. *European Journal of Epidemiology*, 31(12), 1243-1264. <https://doi.org/10.1007/s10654-016-0224-9>
- Ledowsky, C., Mahimbo, A., Scarf, V., & Steel, A. (2022). Women Taking a Folic Acid Supplement in Countries with Mandatory Food Fortification Programs May Be Exceeding the Upper Tolerable Limit of Folic Acid: A Systematic Review. *Nutrients*, 14(13), 2715. <https://doi.org/10.3390/nu14132715>
- Lertxundi, A., Andiarena, A., Martínez, M. D., Ayerdi, M., Murcia, M., Estarlich, M., Guxens, M., Sunyer, J., Julvez, J., & Ibarluzea, J. (2019). Prenatal exposure to PM2.5 and NO2 and sex-dependent infant cognitive and motor development. *Environmental Research*, 174, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.04.001>
- Li, M., Francis, E., Hinkle, S. N., Ajarapu, A. S., & Zhang, C. (2019). Preconception and Prenatal Nutrition and Neurodevelopmental Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 11(7), 1628. <https://doi.org/10.3390/nu11071628>
- Liu, H.-Y., Liu, S.-M., & Zhang, Y.-Z. (2020). Maternal Folic Acid Supplementation Mediates Offspring Health via DNA Methylation. *Reproductive Sciences*, 27(4), 963-976. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00161-2>
- López-Vicente, M., Forns, J., Suades-González, E., Esnaola, M., García-Esteban, R., Álvarez-Pedrerol, M., Júlvez, J., Burgaleta, M., Sebastián-Gallés, N., & Sunyer, J. (2016). Developmental Trajectories in Primary Schoolchildren Using n-Back Task. *Frontiers in Psychology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2016.00716>

- Mahmassani, H. A., Switkowski, K. M., Scott, T. M., Johnson, E. J., Rifas-Shiman, S. L., Oken, E., & Jacques, P. F. (2022). Maternal diet quality during pregnancy and child cognition and behavior in a US cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *115*(1), 128-141. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab325>
- Maruvada, P., Stover, P. J., Mason, J. B., Bailey, R. L., Davis, C. D., Field, M. S., Finnell, R. H., Garza, C., Green, R., Gueant, J.-L., Jacques, P. F., Klurfeld, D. M., Lamers, Y., MacFarlane, A. J., Miller, J. W., Molloy, A. M., O'Connor, D. L., Pfeiffer, C. M., Potischman, N. A., ... Zappalà, G. (2020). Knowledge gaps in understanding the metabolic and clinical effects of excess folates/folic acid: A summary, and perspectives, from an NIH workshop. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *112*(5), 1390-1403. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa259>
- Mastrototaro, G., Zaghi, M., & Sessa, A. (2017). Epigenetic Mistakes in Neurodevelopmental Disorders. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, *61*(4), 590-602. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0900-6>
- McNulty, B., McNulty, H., Marshall, B., Ward, M., Molloy, A. M., Scott, J. M., Dornan, J., & Pentieva, K. (2013). Impact of continuing folic acid after the first trimester of pregnancy: Findings of a randomized trial of Folic Acid Supplementation in the Second and Third Trimesters. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *98*(1), 92-98. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.057489>
- McNulty, H., Rollins, M., Cassidy, T., Caffrey, A., Marshall, B., Dornan, J., McLaughlin, M., McNulty, B. A., Ward, M., Strain, J. J., Molloy, A. M., Lees-Murdock, D. J., Walsh, C. P., & Pentieva, K. (2019). Effect of continued folic acid supplementation beyond the first trimester of pregnancy on cognitive performance in the child: A follow-up study from a randomized controlled trial (FASSTT Offspring Trial). *BMC Medicine*, *17*(1), 196. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1432-4>
- Mendez, M. (2022). *Manual para la exploración neurocognitiva* (1.ª ed.). ELSEVIER.
- Merrell, B. J., & McMurry, J. P. (2022). Folic Acid. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554487/>

- Milman, N., Paszkowski, T., Cetin, I., & Castelo-Branco, C. (2016). Supplementation during pregnancy: Beliefs and science. *Gynecological Endocrinology*, *32*(7), 509-516.  
<https://doi.org/10.3109/09513590.2016.1149161>
- Missanelli, A., Lombardi, N., Bettioli, A., Lanzi, C., Rossi, F., Pacileo, I., Donvito, L., Garofalo, V., Ravaldi, C., Vannacci, A., Mannaioni, G., & Pistelli, A. (2022). Birth outcomes in women exposed to diagnostic radiology procedures during first trimester of pregnancy: A prospective cohort study. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)*, *60*(2), 175-183.  
<https://doi.org/10.1080/15563650.2021.1919693>
- Moscote-Salazar, L., Cincu-Marsalic, R., Agrawal, A., & Quintana, L. (2020). *Neuroanatomía* (1.<sup>a</sup> ed.). Blue Rose Publishers.
- Mullane, J. C., Lawrence, M. A., Corkum, P. V., Klein, R. M., & McLaughlin, E. N. (2016). The development of and interaction among alerting, orienting, and executive attention in children. *Child Neuropsychology*, *22*(2), 155-176.  
<https://doi.org/10.1080/09297049.2014.981252>
- Murphy, M. S. Q., Muldoon, K. A., Sheyholislami, H., Behan, N., Lamers, Y., Rybak, N., White, R. R., Harvey, A. L. J., Gaudet, L. M., Smith, G. N., Walker, M. C., Wen, S. W., & MacFarlane, A. J. (2021). Impact of high-dose folic acid supplementation in pregnancy on biomarkers of folate status and 1-carbon metabolism: An ancillary study of the Folic Acid Clinical Trial (FACT). *The American Journal of Clinical Nutrition*, *113*(5), 1361-1371. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa407>
- Naninck, E. F. G., Stijger, P. C., & Brouwer-Brolsma, E. M. (2019). The Importance of Maternal Folate Status for Brain Development and Function of Offspring. *Advances in Nutrition*, *10*(3), 502-519. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy120>
- Navarrete-Muñoz, E. M., Valera-Gran, D., García de la Hera, M., Gimenez-Monzo, D., Morales, E., Julvez, J., Riaño, I., Tardón, A., Ibarluzea, J., Santa-Marina, L., Murcia, M., Rebagliato, M., & Vioque, J. (2015). Use of high doses of folic acid supplements in pregnant women in Spain: An INMA cohort study. *BMJ Open*, *5*(11), e009202.  
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-009202>
- Navarrete-Muñoz, E. M., Valera-Gran, D., Garcia-de-la-Hera, M., Gonzalez-Palacios, S., Riaño, I., Murcia, M., Lertxundi, A., Guxens, M., Tardón, A., Amiano, P., Vrijheid, M.,

- Rebagliato, M., Vioque, J., & INMA Project. (2019). High doses of folic acid in the periconceptional period and risk of low weight for gestational age at birth in a population based cohort study. *European Journal of Nutrition*, *58*(1), 241-251.  
<https://doi.org/10.1007/s00394-017-1588-7>
- Nevin, N. C., & Seller, MaryJ. (1990). Prevention of neural-tube-defect recurrences. *The Lancet*, *335*(8682), 178-179. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)90060-I](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)90060-I)
- Nieoullon, A. (2002). Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Progress in Neurobiology*, *67*(1), 53-83. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00011-4](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00011-4)
- Nijhout, H. F., Reed, M. C., Budu, P., & Ulrich, C. M. (2004). A mathematical model of the folate cycle: New insights into folate homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(53), 55008-55016. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410818200>
- Nikoloulopoulos, A. K., & Karlis, D. (2008). On modeling count data: A comparison of some well-known discrete distributions. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, *78*(3), 437-457. <https://doi.org/10.1080/10629360601010760>
- Nobre, A. C. (Kia), & Kastner, S. (Eds.). (2014). *The Oxford Handbook of Attention* (Vol. 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780199675111.001.0001>
- Oken, E., Baccarelli, A. A., Gold, D. R., Kleinman, K. P., Litonjua, A. A., De Meo, D., Richardson, J. W., Rifas-Shiman, S. L., Sagiv, S., Taveras, E. M., Weiss, S. T., Belfort, M. B., Burris, H. H., Camargo, C. A., Huh, S. Y., Mantzoros, C., Parker, M. G., & Gillman, M. W. (2015). Cohort Profile: Project Viva. *International Journal of Epidemiology*, *44*(1), 37-48. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu008>
- Osendarp, S. J. M., Brown, K. H., Neufeld, L. M., Udomkesmalee, E., & Moore, S. E. (2020). The double burden of malnutrition—Further perspective. *The Lancet*, *396*(10254), 813. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31364-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31364-7)
- Ouyang, M., Dubois, J., Yu, Q., Mukherjee, P., & Huang, H. (2019). Delineation of early brain development from fetuses to infants with diffusion MRI and beyond. *NeuroImage*, *185*, 836-850. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.04.017>
- Owen, A. M., McMillan, K. M., Laird, A. R., & Bullmore, E. (2005). N-back working memory paradigm: A meta-analysis of normative functional neuroimaging studies. *Human Brain Mapping*, *25*(1), 46-59. <https://doi.org/10.1002/hbm.20131>

- Pachkowski, B. F., Guyton, K. Z., & Sonawane, B. (2011). DNA repair during in utero development: A review of the current state of knowledge, research needs, and potential application in risk assessment. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 728(1-2), 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.05.003>
- Palma Linares, I., Farran, A., & Cantós, D. (2008). *Tablas de composición de alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España = Taules de composició d'aliments per mesures casolanes de consum habitual a Espanya*. Universitat de Barcelona ; McGraw-Hill-Interamericana.
- Papadopoulou, E., Stratakis, N., Roumeliotaki, T., Sarri, K., Merlo, D. F., Kogevinas, M., & Chatzi, L. (2013). The effect of high doses of folic acid and iron supplementation in early-to-mid pregnancy on prematurity and fetal growth retardation: The mother–child cohort study in Crete, Greece (Rhea study). *European Journal of Nutrition*, 52(1), 327-336. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0339-z>
- Papanikolaou, Y., & Fulgoni, V. (2018). Grains Contribute Shortfall Nutrients and Nutrient Density to Older US Adults: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2011–2014. *Nutrients*, 10(5), 534. <https://doi.org/10.3390/nu10050534>
- Park, J. Y., Nicolas, G., Freisling, H., Biessy, C., Scalbert, A., Romieu, I., Chajès, V., Chuang, S.-C., Ericson, U., Wallström, P., Ros, M. M., Peeters, P. H. M., Mattiello, A., Palli, D., María Huerta, J., Amiano, P., Halkjær, J., Dahm, C. C., Trichopoulou, A., ... Slimani, N. (2012). Comparison of standardised dietary folate intake across ten countries participating in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *British Journal of Nutrition*, 108(3), 552-569. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005733>
- Pelegrina, S., Lechuga, M. T., García-Madruga, J. A., Elosúa, M. R., Macizo, P., Carreiras, M., Fuentes, L. J., & Bajo, M. T. (2015). Normative data on the n-back task for children and young adolescents. *Frontiers in Psychology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01544>
- Pentieva, K., Selhub, J., Paul, L., Molloy, A. M., McNulty, B., Ward, M., Marshall, B., Dornan, J., Reilly, R., Parle-McDermott, A., Bradbury, I., Ozaki, M., Scott, J. M., & McNulty, H. (2016). Evidence from a Randomized Trial That Exposure to Supplemental Folic Acid at Recommended Levels during Pregnancy Does Not Lead to Increased Unmetabolized

- Folic Acid Concentrations in Maternal or Cord Blood. *The Journal of Nutrition*, 146(3), 494-500. <https://doi.org/10.3945/jn.115.223644>
- Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. (1991). *Lancet (London, England)*, 338(8760), 131-137.
- Procter, S. B., & Campbell, C. G. (2014). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Nutrition and Lifestyle for a Healthy Pregnancy Outcome. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114(7), 1099-1103. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2014.05.005>
- Puig-Vallverdú, J., Romaguera, D., Fernández-Barrés, S., Gignac, F., Ibarluzea, J., Santa-Maria, L., Llop, S., Gonzalez, S., Vioque, J., Riaño-Galán, I., Fernández-Tardón, G., Pinar, A., Turner, M. C., Arijia, V., Salas-Savadó, J., Vrijheid, M., & Julvez, J. (2022). The association between maternal ultra-processed food consumption during pregnancy and child neuropsychological development: A population-based birth cohort study. *Clinical Nutrition*, 41(10), 2275-2283. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.08.005>
- Raghavan, R., Riley, A. W., Volk, H., Caruso, D., Hironaka, L., Sices, L., Hong, X., Wang, G., Ji, Y., Brucato, M., Wahl, A., Stivers, T., Pearson, C., Zuckerman, B., Stuart, E. A., Landa, R., Fallin, M. D., & Wang, X. (2018). Maternal Multivitamin Intake, Plasma Folate and Vitamin B<sub>12</sub> Levels and Autism Spectrum Disorder Risk in Offspring. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 32(1), 100-111. <https://doi.org/10.1111/ppe.12414>
- Roffman, J. L. (2018). Neuroprotective Effects of Prenatal Folic Acid Supplementation: Why Timing Matters. *JAMA Psychiatry*, 75(7), 747. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2018.0378>
- Rubini, E., Bajens, I. M. M., Horánszky, A., Schoenmakers, S., Sinclair, K. D., Zana, M., Dinnyés, A., Steegers-Theunissen, R. P. M., & Rousian, M. (2021). Maternal One-Carbon Metabolism during the Periconceptional Period and Human Foetal Brain Growth: A Systematic Review. *Genes*, 12(10), 1634. <https://doi.org/10.3390/genes12101634>
- Rueda, M. R., Fan, J., McCandliss, B. D., Halparin, J. D., Gruber, D. B., Lercari, L. P., & Posner, M. I. (2004). Development of attentional networks in childhood. *Neuropsychologia*, 42(8), 1029-1040. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2003.12.012>

- Ruiz-Martín, H. (2020). *¿Cómo aprendemos?: Una aproximación científica al aprendizaje y la enseñanza* (2.ª ed., Vol. 1). Graó.
- Sagiv, S. K., Thurston, S. W., Bellinger, D. C., Altshul, L. M., & Korrick, S. A. (2012). Neuropsychological measures of attention and impulse control among 8-year-old children exposed prenatally to organochlorines. *Environmental Health Perspectives*, *120*(6), 904-909. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104372>
- Sampaio, A. C., Matos, F. F. de, Lopes, L. de L., Marques, Í. M. M., Tavares, R. M., Fernandes, M. V. de M., Teixeira, M. R. V. da S., Brito, A. B. de, Feitosa, A. C., Guedes, T. O., & Mota, M. L. (2021). Association of the Maternal Folic Acid Supplementation with the Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics*, *43*(10), 775-781. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1736298>
- Schlotz, W., Jones, A., Phillips, D. I. W., Gale, C. R., Robinson, S. M., & Godfrey, K. M. (2010). Lower maternal folate status in early pregnancy is associated with childhood hyperactivity and peer problems in offspring: Folate status in pregnancy and offspring childhood behavioural difficulties. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, *51*(5), 594-602. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2009.02182.x>
- Scholl, T. O., & Johnson, W. G. (2000). Folic acid: Influence on the outcome of pregnancy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *71*(5), 1295S-1303S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.5.1295s>
- Schwartz, S. O., Kaplan, S. R., & Armstrong, B. E. (1950). The long-term evaluation of folic acid in the treatment of pernicious anemia. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *35*(6), 894-898.
- Schwarzenberg, S. J., Georgieff, M. K., COMMITTEE ON NUTRITION, Daniels, S., Corkins, M., Golden, N. H., Kim, J. H., Lindsey, C. W., & Magge, S. N. (2018). Advocacy for Improving Nutrition in the First 1000 Days to Support Childhood Development and Adult Health. *Pediatrics*, *141*(2), e20173716. <https://doi.org/10.1542/peds.2017-3716>
- Selhub, J., & Rosenberg, I. H. (2016). Excessive folic acid intake and relation to adverse health outcome. *Biochimie*, *126*, 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.04.010>

- Shallice, T. (2002). Fractionation of the Supervisory System. En D. T. Stuss & R. T. Knight (Eds.), *Principles of Frontal Lobe Function* (pp. 261-277). Oxford University Press.  
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195134971.003.0017>
- Shane, B. (2008). Folate and Vitamin B<sub>12</sub> Metabolism: Overview and Interaction with Riboflavin, Vitamin B<sub>6</sub>, and Polymorphisms. *Food and Nutrition Bulletin*, 29(2\_suppl1), S5-S16.  
<https://doi.org/10.1177/15648265080292S103>
- Shields, R., Khan, O., Lim Choi Keung, S., Hawkes, A. J., Barry, A., Devall, A. J., Quinn, S. D., Keay, S. D., Arvanitis, T. N., Bick, D., & Quenby, S. (2022). Quantitative assessment of pregnancy outcome following recurrent miscarriage clinic care: A prospective cohort study. *BMJ Open*, 12(2), e052661. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-052661>
- Shulpekova, Y., Nechaev, V., Kardasheva, S., Sedova, A., Kurbatova, A., Bueverova, E., Kopylov, A., Malsagova, K., Dlamini, J. C., & Ivashkin, V. (2021). The Concept of Folic Acid in Health and Disease. *Molecules*, 26(12), 3731.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26123731>
- Silva, C., Keating, E., & Pinto, E. (2017). The impact of folic acid supplementation on gestational and long term health: Critical temporal windows, benefits and risks. *Porto Biomedical Journal*, 2(6), 315-332. <https://doi.org/10.1016/j.pbj.2017.05.006>
- Smithells, R. W., Sheppard, S., Schorah, C. J., Seller, M. J., Nevin, N. C., Harris, R., Read, A. P., & Fielding, D. W. (1980). POSSIBLE PREVENTION OF NEURAL-TUBE DEFECTS BY PERICONCEPTIONAL VITAMIN SUPPLEMENTATION. *The Lancet*, 315(8164), 339-340. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)90886-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)90886-7)
- Smithells, R. W., Sheppard, S., Wild, J., & Schorah, C. J. (1989). PREVENTION OF NEURAL TUBE DEFECT RECURRENCES IN YORKSHIRE: FINAL REPORT. *The Lancet*, 334(8661), 498-499. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)92103-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)92103-X)
- Soma-Pillay, P., Nelson-Piercy, C., Tolppanen, H., & Mebazaa, A. (2016). Physiological changes in pregnancy. *Cardiovascular Journal of Africa*, 27(2), 89-94.  
<https://doi.org/10.5830/CVJA-2016-021>
- Spencer-Smith, M., & Klingberg, T. (2015). Benefits of a Working Memory Training Program for Inattention in Daily Life: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 10(3), e0119522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119522>



- Šrám, R. J., Binková, B., Dejmek, J., & Bobak, M. (2005). Ambient Air Pollution and Pregnancy Outcomes: A Review of the Literature. *Environmental Health Perspectives*, 113(4), 375-382. <https://doi.org/10.1289/ehp.6362>
- Stephenson, J., Heslehurst, N., Hall, J., Schoenaker, D. A. J. M., Hutchinson, J., Cade, J. E., Poston, L., Barrett, G., Crozier, S. R., Barker, M., Kumaran, K., Yajnik, C. S., Baird, J., & Mishra, G. D. (2018). Before the beginning: Nutrition and lifestyle in the preconception period and its importance for future health. *The Lancet*, 391(10132), 1830-1841. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30311-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30311-8)
- Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The Basics of Brain Development. *Neuropsychology Review*, 20(4), 327-348. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>
- Suades-González, E., Forns, J., García-Esteban, R., López-Vicente, M., Esnaola, M., Álvarez-Pedrerol, M., Julvez, J., Cáceres, A., Basagaña, X., López-Sala, A., & Sunyer, J. (2017). A Longitudinal Study on Attention Development in Primary School Children with and without Teacher-Reported Symptoms of ADHD. *Frontiers in Psychology*, 8, 655. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.00655>
- Sunyer, J., Esnaola, M., Alvarez-Pedrerol, M., Forns, J., Rivas, I., López-Vicente, M., Suades-González, E., Foraster, M., Garcia-Esteban, R., Basagaña, X., Viana, M., Cirach, M., Moreno, T., Alastuey, A., Sebastian-Galles, N., Nieuwenhuijsen, M., & Querol, X. (2015). Association between Traffic-Related Air Pollution in Schools and Cognitive Development in Primary School Children: A Prospective Cohort Study. *PLOS Medicine*, 12(3), e1001792. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001792>
- Tamura, T., Goldenberg, R. L., Chapman, V. R., Johnston, K. E., Ramey, S. L., & Nelson, K. G. (2005). Folate Status of Mothers During Pregnancy and Mental and Psychomotor Development of Their Children at Five Years of Age. *Pediatrics*, 116(3), 703-708. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-2189>
- Tamura, T., & Picciano, M. F. (2006). Folate and human reproduction. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(5), 993-1016. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.5.993>
- Tau, G. Z., & Peterson, B. S. (2010). Normal Development of Brain Circuits. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 147-168. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.115>

- Thomas Yeo, B. T., Krienen, F. M., Sepulcre, J., Sabuncu, M. R., Lashkari, D., Hollinshead, M., Roffman, J. L., Smoller, J. W., Zöllei, L., Polimeni, J. R., Fischl, B., Liu, H., & Buckner, R. L. (2011). The organization of the human cerebral cortex estimated by intrinsic functional connectivity. *Journal of Neurophysiology*, *106*(3), 1125-1165.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00338.2011>
- Thomason, M. E., Race, E., Burrows, B., Whitfield-Gabrieli, S., Glover, G. H., & Gabrieli, J. D. E. (2009). Development of Spatial and Verbal Working Memory Capacity in the Human Brain. *Journal of Cognitive Neuroscience*, *21*(2), 316-332.  
<https://doi.org/10.1162/jocn.2008.21028>
- Timmermans, S., Steegers-Theunissen, R. P., Vujkovic, M., den Breeijen, H., Russcher, H., Lindemans, J., Mackenbach, J., Hofman, A., Lesaffre, E. E., Jaddoe, V. V., & Steegers, E. A. (2012). The Mediterranean diet and fetal size parameters: The Generation R Study. *The British Journal of Nutrition*, *108*(8), 1399-1409.  
<https://doi.org/10.1017/S000711451100691X>
- Tyagi, R., Verma, S., Dash, N., Rohit, M. K., Sankhyan, N., & Attri, S. V. (2022). Folate Deficiency: A Possible Association with Congenital Heart Defects. *Indian Journal of Pediatrics*, *89*(10), 1013-1015. <https://doi.org/10.1007/s12098-022-04125-z>
- U.S. Department of Agriculture (USDA). (2010). *Agriculture Research Service 2010 USDA National Nutrient Database for Standard Reference; Release 23*. Nutrient Data Laboratory: Washington (DC).
- US Food and Drug Administration. (1996). *Food Standards: Amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid, final rule*. Fed. Regist.
- Valera-Gran, D., García de la Hera, M., Navarrete-Muñoz, E. M., Fernandez-Somoano, A., Tardón, A., Julvez, J., Forns, J., Lertxundi, N., Ibarluzea, J. M., Murcia, M., Rebagliato, M., & Vioque, J. (2014). Folic Acid Supplements During Pregnancy and Child Psychomotor Development After the First Year of Life. *JAMA Pediatrics*, *168*(11), e142611. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.2611>
- Valera-Gran, D., Navarrete-Muñoz, E. M., Garcia de la Hera, M., Fernández-Somoano, A., Tardón, A., Ibarluzea, J., Balluerka, N., Murcia, M., González-Safont, L., Romaguera, D., Julvez, J., Vioque, J., & INMA Project. (2017). Effect of maternal high dosages of

- folic acid supplements on neurocognitive development in children at 4-5 y of age: The prospective birth cohort Infancia y Medio Ambiente (INMA) study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 106(3), 878-887. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.152769>
- Veena, S. R., Gale, C. R., Krishnaveni, G. V., Kehoe, S. H., Srinivasan, K., & Fall, C. H. (2016). Association between maternal nutritional status in pregnancy and offspring cognitive function during childhood and adolescence; a systematic review. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 16(1), 220. <https://doi.org/10.1186/s12884-016-1011-z>
- Veena, S. R., Krishnaveni, G. V., Srinivasan, K., Wills, A. K., Muthayya, S., Kurpad, A. V., Yajnik, C. S., & Fall, C. H. D. (2010). Higher Maternal Plasma Folate but Not Vitamin B-12 Concentrations during Pregnancy Are Associated with Better Cognitive Function Scores in 9- to 10- Year-Old Children in South India. *The Journal of Nutrition*, 140(5), 1014-1022. <https://doi.org/10.3945/jn.109.118075>
- Vioque, J., Garcia-de-la-Hera, M., Gonzalez-Palacios, S., Torres-Collado, L., Notario-Barandiaran, L., Oncina-Canovas, A., Soler-Blasco, R., Lozano, M., Beneito, A., & Navarrete-Muñoz, E.-M. (2019). Reproducibility and Validity of a Short Food Frequency Questionnaire for Dietary Assessment in Children Aged 7–9 Years in Spain. *Nutrients*, 11(4), 933. <https://doi.org/10.3390/nu11040933>
- Vioque, J., Gimenez-Monzo, D., Navarrete-Muñoz, E. M., Garcia-de-la-Hera, M., Gonzalez-Palacios, S., Rebagliato, M., Ballester, F., Murcia, M., Iñiguez, C., Granado, F., & INMA-Valencia Cohort Study. (2016). Reproducibility and Validity of a Food Frequency Questionnaire Designed to Assess Diet in Children Aged 4-5 Years. *PLOS ONE*, 11(11), e0167338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167338>
- Vioque, J., Navarrete-Muñoz, E.-M., Gimenez-Monzó, D., García-de-la-Hera, M., Granado, F., Young, I. S., Ramón, R., Ballester, F., Murcia, M., Rebagliato, M., Iñiguez, C., & INMA-Valencia Cohort Study. (2013). Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire among pregnant women in a Mediterranean area. *Nutrition Journal*, 12, 26. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-12-26>
- Virdi, S., & Jadavji, N. M. (2022). The Impact of Maternal Folates on Brain Development and Function after Birth. *Metabolites*, 12(9), 876. <https://doi.org/10.3390/metabo12090876>

- Vohr, B. R., Poggi Davis, E., Wanke, C. A., & Krebs, N. F. (2017). Neurodevelopment: The Impact of Nutrition and Inflammation During Preconception and Pregnancy in Low-Resource Settings. *Pediatrics*, *139*(Supplement\_1), S38-S49.  
<https://doi.org/10.1542/peds.2016-2828F>
- Vuontela, V., Carlson, S., Troberg, A.-M., Fontell, T., Simola, P., Saarinen, S., & Aronen, E. T. (2013). Working Memory, Attention, Inhibition, and Their Relation to Adaptive Functioning and Behavioral/Emotional Symptoms in School-Aged Children. *Child Psychiatry & Human Development*, *44*(1), 105-122. <https://doi.org/10.1007/s10578-012-0313-2>
- Vuontela, V., Steenari, M.-R., Aronen, E. T., Korvenoja, A., Aronen, H. J., & Carlson, S. (2009). Brain activation and deactivation during location and color working memory tasks in 11–13-year-old children. *Brain and Cognition*, *69*(1), 56-64.  
<https://doi.org/10.1016/j.bandc.2008.05.010>
- Vuontela, V., Steenari, M.-R., Carlson, S., Koivisto, J., Fjällberg, M., & Aronen, E. T. (2003). Audiospatial and Visuospatial Working Memory in 6–13 Year Old School Children. *Learning & Memory*, *10*(1), 74-81. <https://doi.org/10.1101/lm.53503>
- Wells, J. C., Sawaya, A. L., Wibaek, R., Mwangome, M., Poullas, M. S., Yajnik, C. S., & Demayo, A. (2020). The double burden of malnutrition: Aetiological pathways and consequences for health. *The Lancet*, *395*(10217), 75-88.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32472-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32472-9)
- Wheelock, M. D., Hect, J. L., Hernandez-Andrade, E., Hassan, S. S., Romero, R., Eggebrecht, A. T., & Thomason, M. E. (2019). Sex differences in functional connectivity during fetal brain development. *Developmental Cognitive Neuroscience*, *36*, 100632.  
<https://doi.org/10.1016/j.dcn.2019.100632>
- WHO antenatal care recommendations for a positive pregnancy experience: Nutritional interventions update: Vitamin D supplements during pregnancy.* (2020). World Health Organization. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560398/>
- Wiens, D., & DeSoto, M. (2017). Is High Folic Acid Intake a Risk Factor for Autism?—A Review. *Brain Sciences*, *7*(12), 149. <https://doi.org/10.3390/brainsci7110149>

- Will, J. J., Mueller, J. F., Brodine, C., Kiely, C. E., Friedman, B., Hawkins, V. R., Dutra, J., & Vilter, R. W. (1959). Folic acid and vitamin B12 in pernicious anemia; studies on patients treated with these substances over a ten year period. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 53(1), 22-38.
- Willett, W. C., Howe, G. R., & Kushi, L. H. (1997). Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65(4), 1220S-1228S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/65.4.1220S>
- Willett, W. C., Sampson, L., Stampfer, M. J., Rosner, B., Bain, C., Witschi, J., Hennekens, C. H., & Speizer, F. E. (1985). REPRODUCIBILITY AND VALIDITY OF A SEMIQUANTITATIVE FOOD FREQUENCY QUESTIONNAIRE. *American Journal of Epidemiology*, 122(1), 51-65. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114086>
- Wilson, R. D., & O'Connor, D. L. (2021). Maternal folic acid and multivitamin supplementation: International clinical evidence with considerations for the prevention of folate-sensitive birth defects. *Preventive Medicine Reports*, 24, 101617. <https://doi.org/10.1016/j.pmedr.2021.101617>
- Wilson, R. D., & O'Connor, D. L. (2022). Guideline No. 427: Folic Acid and Multivitamin Supplementation for Prevention of Folic Acid–Sensitive Congenital Anomalies. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 44(6), 707-719.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jogc.2022.04.004>
- Wojtowicz, A., Babczyk, D., Galas, A., Skalska-Swistek, M., Gorecka, M., Witkowski, R., & Huras, H. (2022). Evaluation of the prevalence of folic acid supplementation before conception and through the first 12 weeks of pregnancy in Polish women at high risk of fetal anomalies. *Ginekologia Polska*. <https://doi.org/10.5603/GP.a2021.0192>
- Wu, K., Taki, Y., Sato, K., Hashizume, H., Sassa, Y., Takeuchi, H., Thyreau, B., He, Y., Evans, A. C., Li, X., Kawashima, R., & Fukuda, H. (2013). Topological Organization of Functional Brain Networks in Healthy Children: Differences in Relation to Age, Sex, and Intelligence. *PLoS ONE*, 8(2), e55347. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055347>
- Yaman, M., Çatak, J., Uğur, H., Gürbüz, M., Belli, İ., Tanyıldız, S. N., Yıldırım, H., Cengiz, S., Yavuz, B. B., Kişmiroğlu, C., Özgür, B., & Yaldız, M. C. (2021). The bioaccessibility of

- water-soluble vitamins: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 552-563.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.056>
- Yang, J., Kang, Y., Cheng, Y., Zeng, L., Yan, H., & Dang, S. (2019). Maternal Dietary Patterns during Pregnancy and Congenital Heart Defects: A Case-Control Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(16), 2957.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph16162957>
- Yu, C., & Yao, W. (2017). Robust linear regression: A review and comparison. *Communications in Statistics - Simulation and Computation*, 46(8), 6261-6282.  
<https://doi.org/10.1080/03610918.2016.1202271>
- Zaganjor, I., Sekkarie, A., Tsang, B. L., Williams, J., Razzaghi, H., Mulinare, J., Sniezek, J. E., Cannon, M. J., & Rosenthal, J. (2016). Describing the Prevalence of Neural Tube Defects Worldwide: A Systematic Literature Review. *PLOS ONE*, 11(4), e0151586.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151586>
- Zaidat, O., Miles, D., & Lerner, A. (2020). *The Little Black Book of Neurology. 6th Edition* (6th ed.). ELSEVIER.
- Zhang, J., Jin, L., Wang, D., Wang, C., Tong, M., Yu, J., Meng, W., Ren, A., & Jin, L. (2021). Maternal periconceptional folic acid supplements use and fetus risk for limb defects. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 35(6), 645-653.  
<https://doi.org/10.1111/ppe.12775>
- Zhao, L. N., & Kaldis, P. (2022). Pairing structural reconstruction with catalytic competence to evaluate the mechanisms of key enzymes in the folate-mediated one-carbon pathway. *The FEBS Journal*, febs.16439. <https://doi.org/10.1111/febs.16439>
- Zhao, R., Diop-Bove, N., Visentin, M., & Goldman, I. D. (2011). Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. *Annual Review of Nutrition*, 31, 177-201. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-072610-145133>



## ANEXO 1

---

Cuestionario de Frecuencia de Alimentos validado en madres embarazadas del estudio INMA.





**CUESTIONARIO DE FRECUENCIA ALIMENTARIA Nº 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.

<b>I. LACTEOS</b>	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+
1. Leche entera (1 vaso o taza, 200 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
2. Leche semi-desnatada (1 vaso, 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
3. Leche desnatada (1 vaso, 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
4. Leche condensada (1 cucharada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
5. Nata o crema de leche (1 cucharada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
6. Yogur entero (uno, 125 gramos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
7. Yogur desnatado (uno, 125 gramos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
8. Requesón, queso blanco o fresco (una porción o ración, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
9. Queso curado, semicurado, o cremoso (un trozo, 50 gramos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
10. Natillas, flan, puding (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
11. Helados (1 cucurucho, vasito o bola)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
<b>II. HUEVOS, CARNES, PESCADOS</b>	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+
12. Huevos de gallina (uno)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
13. Pollo CON piel (1 plato mediano o pieza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
14. Pollo SIN piel (1 plato mediano o pieza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
15. Carne de ternera, cerdo, cordero como plato principal (1 plato mediano o pieza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
16. Carne de caza: conejo, codorniz, pato (1 plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
17. Hígado de ternera, cerdo, pollo (1 plato, ración o pieza mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
18. Vísceras: callos, sesos, mollejas ( 1 ración, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
19. Embutidos: jamón, salchichón, salami, mortadela, (1 ración de unos 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
20. Salchichas y similares (una mediana)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
21. Patés, foie-gras (media ración, 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
22. Hamburguesa (una mediana, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
23. Tocino, beicon, panceta (2 tiras o lonchas, 50 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
24. Pescado frito variado (1 plato mediano o ración)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
25. Pescado hervido o plancha BLANCO: merluza, lenguado, dorada (1 plato o ración)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
26. Pescado hervido o plancha AZUL: atún, emperador, bonito, (plato o ración)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
27. Otros pescados azules: caballa, sardinas, boquerón/anchoas, salmón	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
28. Una lata pequeña de conserva de atún o bonito en aceite	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
29. Una lata pequeña de conserva de sardinas o caballa en aceite	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
30. Pescados en salazón y/o ahumados: anchoas, bacalao, salmón (media ración, 50g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
31. Almejas, mejillones, ostras (1 ración, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
32. Calamares, chipirones, sepia, choco, pulpo (1 ración o plato, 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
33. Marisco: gambas, cangrejo, langostino, langosta (1 ración 100 g)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

<b>III. VERDURAS, LEGUMBRES.</b>	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
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
<b>IV. FRUTAS</b>	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
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
<b>V. PAN, CEREALES Y SIMILARES</b>	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
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
<b>VI. ACEITES, GRASAS Y DULCES</b>	Nunca ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
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 ó <1 mes	1-3 por mes	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por día	2-3 por día	4-5 por día	6+ por día
76. Vino tinto (1 vaso, 125 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
77. Vino blanco o rosado (1 vaso, 125 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
78. Jerez, vinos secos, vermú (copa, 50 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
79. Cerveza (una caña o botellín 1/5, 200 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
80. Cerveza sin alcohol (una caña o botellín 1/5, 200 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
81. Licores (20-25º): de frutas (manzana), de crema (Catalana, Bayleys) (1 copa, 50 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
82. Brandy, ginebra, ron, whisky, vodka, aguardientes 40º (1 copa, 50 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
83. Refrescos normales de cola, naranja, limón (ej. coca-cola, fanta) (Uno, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
84. Refrescos sin azúcar cola, naranja, limón (ej. coca-cola o pepsi light) (Uno, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
85. Agua del grifo (1 vaso, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
86. Agua embotellada sin gas (1 vaso, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
87. Agua embotellada con gas (1 vaso, 250 cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
88. Zumo de frutas envasado (1 vaso o envase de 200cc)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
89. Café (1 taza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
90. Café descafeinado (1 taza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
91. Té o infusiones (1 taza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
92. Sopa o puré de verduras (un plato)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
93. Croquetas de pollo, jamón (una)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
94. Croquetas, palitos o delicias de pescado fritos (una)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
95. Mayonesa (1 cucharada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
96. Salsa de tomate (media taza)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
97. Ketchup ó catchup (1 cucharada sopera)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
98. Sal añadida a los platos en la mesa (1 pizca del salero o pellizco con dos dedos)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
99. Ajo (1 diente)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
100. Mermeladas, miel (1 cucharada)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
101. Azúcar (ej. en el café, postres, etc.) (1 cucharadita)	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

¿Consume algún otro alimento regularmente al menos una vez a la semana?

-----	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
-----	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨

**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	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____
b. Leche con vit A+D	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____
c. Leche rica en Calcio	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____
d. Fibra/sup ricos en fibra	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____
e. Multivitaminas	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____
f. Acido fólico	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____
g. Complejo A + E	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____
h. Vitamina A	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____
i. Vitamina E	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____
j. Vitamina C	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____
i. Hierro	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____
j. Calcio	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____
I. Complejo B	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____
m. Zinc	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____
n. Otros Suplementos	-----	-----	___/____	① Si ② No	___/____

1. ¿Ha seguido usted algún tipo de dieta desde la última entrevista?

(Si responde **NO** pasar a pregunta 3)

- ① No    ② Sí    ③ No sabe/No contesta

2. ¿Podría indicar el motivo de seguir esta dieta? Puede marcar más de una respuesta

- ① para controlar su peso
- ② porque tiene colesterol
- ③ porque tiene azúcar o diabetes
- ④ porque tiene problemas de estómago
- ⑤ porque tiene problemas de vesícula o hígado
- ⑥ porque tiene problemas de tensión alta o de corazón
- ⑦ porque tiene problemas de riñón
- ⑧ porque tiene alergia a algunos alimentos
- ⑨ porque tiene ácido úrico o gota
- ⑩ porque es vegetariana
- ⑪ por otro motivo, ¿cual? \_\_\_\_\_

3. Desde la última entrevista ¿cómo ha cambiado su ingesta para los siguientes grupos de alimentos, con respecto a la del año antes del embarazo?

	Eliminado	↓	Igual	↑	Ns/Nc
a. Lácteos y derivados	①	②	③	④	⑤
b. Huevos	①	②	③	④	⑤
c. Carne	①	②	③	④	⑤
d. Pescado	①	②	③	④	⑤
e. Verduras	①	②	③	④	⑤
f. Legumbres	①	②	③	④	⑤
g. Frutas	①	②	③	④	⑤
h. Pan	①	②	③	④	⑤
i. Aceite de oliva	①	②	③	④	⑤
j. Mantequilla/margarina	①	②	③	④	⑤
k. Azúcar/dulces	①	②	③	④	⑤
l. Bebidas alcohólicas	①	②	③	④	⑤

4. ¿Con qué frecuencia come comidas fritas?

- ① A diario.
  - ② 5-6 veces por semana.
  - ③ 2-4 veces por semana.
  - ④ 1 vez por semana.
  - ⑤ Menos de 1 vez por semana.
- ⑥ Ns/Nc

5. ¿Cuándo come carne, cómo de hecha le gusta comerla?

- ① No como carne (pasar a pregunta 9)
- ② Cruda
- ③ Poco hecha
- ④ Hecha
- ⑤ Muy hecha.
- ⑥ Ns/Nc

6. ¿Qué hace Vd. con la grasa visible, cuando come carne?

- ① La quita toda.
- ② Quita la mayoría.
- ③ Quita un poco.
- ④ No quita nada.
- ⑤ Ns/Nc

7. ¿Cómo suele comer la carne

	. Veces al .				Ns/Nc
	Nunca	Mes	Semana	Día	
a. A la plancha	___	___	___	___	___
b. A la parrilla (grill)	___	___	___	___	___
c. Asada (horno)	___	___	___	___	___
d. Frita en aceite	___	___	___	___	___
e. Guisada	___	___	___	___	___

8. ¿Cómo de frecuente come lo tostado o quemado de la carne?

- ① Nunca o menos de una vez al mes
- ② Una vez al mes
- ③ 2-3 veces al mes
- ④ 1 vez a la semana
- ⑤ 2 o más veces a la semana
- ⑥ Ns/Nc

9. ¿Cómo de frecuente come la parte tostada del pescado?

- ① Nunca o menos de una vez al mes
- ② Una vez al mes
- ③ 2-3 veces al mes
- ④ 1 vez a la semana
- ⑤ 2 o más veces a la semana
- ⑥ Ns/Nc

10. ¿Cómo de frecuente come el tostado (socarrat) de la paella?

- ① Nunca o menos de una vez al mes
- ② Una vez al mes
- ③ 2-3 veces al mes
- ④ 1 vez a la semana
- ⑤ 2 o más veces a la semana
- ⑥ Ns/Nc

11. ¿Qué clase de grasa o aceite usa para:

	Mantequilla	Margarina	Ac.Oliva	Ac.Ol virgen	Ac. Veg	Mezcla Ac.
<b>ALIÑAR</b>	___	___	___	___	___	___
<b>COCINAR</b>	___	___	___	___	___	___
<b>FREIR</b>	___	___	___	___	___	___

### ACTIVIDAD FISICA Y EJERCICIO durante el embarazo (desde la última entrevista)

1. Desde la última entrevista, ¿podría indicarme Vd. cuántas horas al día suele dormir, incluida la siesta?

\_\_\_\_\_ horas

2. ¿Cuántos minutos de siesta suele dormir al día?

\_\_\_\_\_ min.

3. ¿Cuántas horas ve usted la televisión, a la semana? (ajustar al número entero más cercano)

\_\_\_\_\_ horas

4. En su actividad en el trabajo u ocupación principal está...

- ① Casi siempre sentado
- ② Sentado la mitad del tiempo
- ③ Casi siempre de pie, quieto
- ④ Casi siempre caminando, levantando y llevando pocas cosas
- ⑤ Casi siempre caminando, levantando y llevando muchas cosas
- ⑥ Trabajo manual pesado

5. ¿Cuánto tiempo camina o hace bicicleta al día?

- ① Casi nunca
- ② Menos de 20 minutos al día
- ③ 20-40 minutos al día
- ④ 40-60 minutos al día
- ⑤ Entre 1 y 1 hora y media al día
- ⑥ Más de 1 hora y media al día

6. ¿Cuánto tiempo dedica a actividades o tareas en casa?

- ① Menos de 1 hora al día
- ② 1-2 horas / día
- ③ 3-4 horas / día
- ④ 5-6 horas / día
- ⑤ 7-8 horas / día
- ⑥ Más de 8 horas / día

7. En su actividad en tiempo libre, ¿cuánto tiempo dedica a ver televisión, ordenador o leer?

- ① Menos de 1 hora al día
- ② 1 hora / día
- ③ 2 horas / día
- ④ 3 horas / día
- ⑤ 4 horas / día
- ⑥ 5-6 horas / día
- ⑦ Más de 6 horas / día

8. En su actividad en tiempo libre, ¿cuánto tiempo dedica a hacer ejercicio o deporte

- ① Menos de 1 hora a la semana
- ② 1 hora / semana
- ③ 2 horas / semana
- ④ 3 horas / semana
- ⑤ 4-5 horas / semana
- ⑥ Más de 5 horas / semana

9. Considerando toda su actividad física (trabajo u ocupación principal, hogar y tiempo libre), ¿cómo se considera Vd.?

- ① **Sedentaria** (sentado casi siempre, sin actividad física, sin deporte, bajo cuidados).
- ② **Poco activa** (profesiones o actividades sentadas, amas de casa con electrodomésticos, escaso deporte).
- ③ **Moderadamente activa** (trabajos manuales, amas de casa sin electrodomésticos, deporte ligero, etc)
- ④ **Bastante activa** (trabajos o actividades de pie-andando, deporte intenso, etc.).
- ⑤ **Muy activa** (Trabajo muy vigoroso, deporte fuerte diario)
- ⑥ No sabe / no contesta

## ANEXO 2

---

Primer artículo incluido en esta tesis doctoral.



## Article

# The Use of Lower or Higher Than Recommended Doses of Folic Acid Supplements during Pregnancy Is Associated with Child Attentional Dysfunction at 4–5 Years of Age in the INMA Project

Laura María Compañ Gabucio <sup>1,2</sup> , Manuela García de la Hera <sup>1,2,3,\*</sup> , Laura Torres Collado <sup>1,2,3</sup> , Ana Fernández-Somoano <sup>3,4,5</sup> , Adonina Tardón <sup>3,4,5</sup> , Mònica Guxens <sup>3,6,7,8</sup> , Martine Vrijheid <sup>3,6,7</sup> , Marisa Rebagliato <sup>3,9,10</sup> , Mario Murcia <sup>3,9,11</sup> , Jesús Ibarluzea <sup>3,12,13,14</sup> , Itxaso Martí <sup>12,15</sup> and Jesús Vioque <sup>1,2,3</sup> 

- <sup>1</sup> Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante, ISABIAL-UMH, 03010 Alicante, Spain; lcompan@umh.es (L.M.C.G.); l.torres@umh.es (L.T.C.); vioque@umh.es (J.V.)
  - <sup>2</sup> Unidad de Epidemiología de la Nutrición, Departamento de Salud Pública, Historia de la Ciencia y Ginecología, Universidad Miguel Hernández (UMH), 03550 Alicante, Spain
  - <sup>3</sup> CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, 28034 Madrid, Spain; fernandezsana@uniovi.es (A.F.-S.); atardon@uniovi.es (A.T.); monica.guxens@isglobal.org (M.G.); martine.vrijheid@isglobal.org (M.V.); rebaglia@med.uji.es (M.R.); murcia\_mar@gva.es (M.M.); mambien3-san@euskadi.eus (J.I.)
  - <sup>4</sup> IUOPA-Departamento de Medicina, Universidad de Oviedo, 33003 Oviedo, Spain
  - <sup>5</sup> Departamento de Epidemiología Ambiental y Molecular del Cáncer, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Roma Avenue s/n, 33001 Oviedo, Asturias, Spain
  - <sup>6</sup> Department of Childhood & Environment, Barcelona Institute for Global Health-ISGlobal, 08036 Barcelona, Spain
  - <sup>7</sup> Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra (UPF), 08002 Barcelona, Spain
  - <sup>8</sup> Department of Child and Adolescent Psychiatry, Erasmus MC, University Medical Centre, 3015 GD Rotterdam, The Netherlands
  - <sup>9</sup> Epidemiology and Environmental Health Joint Research Unit, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region, FISABIO-Public Health, FISABIO-Universitat Jaume I-Universitat de València, 46015 Valencia, Spain
  - <sup>10</sup> Department of Medicine, Universitat Jaume I, 12071 Castellón de la Plana, Spain
  - <sup>11</sup> Servicio de Análisis de Sistemas de Información Sanitaria, Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana, 46010 Valencia, Spain
  - <sup>12</sup> Group of Environmental Epidemiology, Biodonostia Health Research Institute, 20014 Donostia-San Sebastián, Spain; itxasomarti@gmail.com
  - <sup>13</sup> Ministry of Health of the Basque Government, Sub-Directorate for Public Health and Addictions of Gipuzkoa, 20013 San Sebastián, Spain
  - <sup>14</sup> School of Psychology, University of the Basque Country UPV/EHU, 20018 San Sebastián, Spain
  - <sup>15</sup> Pediatric Neurology Department, Donostia University Hospital, Osakidetza Basque Health Service, 20014 San Sebastián, Spain
- \* Correspondence: manoli@umh.es; Tel.: +34-965-919-505



**Citation:** Compañ Gabucio, L.M.; García de la Hera, M.; Torres Collado, L.; Fernández-Somoano, A.; Tardón, A.; Guxens, M.; Vrijheid, M.; Rebagliato, M.; Murcia, M.; Ibarluzea, J.; et al. The Use of Lower or Higher Than Recommended Doses of Folic Acid Supplements during Pregnancy Is Associated with Child Attentional Dysfunction at 4–5 Years of Age in the INMA Project. *Nutrients* **2021**, *13*, 327. <https://doi.org/10.3390/nu13020327>

Received: 15 December 2020

Accepted: 19 January 2021

Published: 23 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** We assessed the association between the use of lower- and higher-than-recommended doses of folic acid supplements (FAs) during pregnancy and attentional function in boys and girls at age of 4–5. We analyzed data from 1329 mother-child pairs from the mother-child cohort Infancia y Medio Ambiente Project (INMA) study. Information on FAs use during pregnancy was collected in personal interviews at weeks 12 and 30, and categorized in <400, 400–999 (recommended dose), and  $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{day}$ . Child attentional function was assessed by Conners' Kiddie Continuous Performance Test. Multivariable regression analyses were used to estimate incidence rate ratios (IRR) and beta coefficients with 95% confidence intervals (CI). Compared to recommended FAs doses, the periconceptional use of <400 and  $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{day}$  was associated with higher risk of omission errors—IRR = 1.14 (95% CI: 1.01; 1.29) and IRR = 1.16 (95% CI: 1.02; 1.33), respectively. The use of FAs < 400  $\mu\text{g}/\text{day}$  and  $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{day}$  was significantly associated with deficits of attentional function only in boys. FAs use < 400  $\mu\text{g}/\text{day}$  was associated with higher omission errors with IRR = 1.22 and increased hit reaction time (HRT)  $\beta = 34.36$ , and FAs use  $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{day}$  was associated with

increased HRT  $\beta = 33.18$  and HRT standard error  $\beta = 3.31$ . The periconceptional use of FAs below or above the recommended doses is associated with deficits of attentional function in children at age of 4–5, particularly in boys.

**Keywords:** folic acid; supplement use; pregnancy; attentional function; neurodevelopment; children

## 1. Introduction

An adequate dietary intake and periconceptional use of folic acid supplements during the embryonic period is crucial in several fetal physiological and cellular processes [1] that are essential for the optimal early and late development of the child's brain and cognitive function [2,3]. The folic acid (synthetic form of folate) is an essential micronutrient required for many metabolic processes such as the metabolism of carbon-1 and for S-adenosylmethionine (SAM) production [4], nucleotide synthesis, DNA repair, methylation reactions, myelination, and synthesis of neurotransmitters [5,6]. There is also evidence from animal studies suggesting that the effect of folic acid supplements (FAs) modulating DNA methylation reactions and the brain development of the child, may be different according to sex [7].

Based on the initial results of the Medical Research Council (MRC) clinical trial and subsequent evidence, a daily dose of 400  $\mu\text{g}/\text{day}$  from folic acid (FA) in the periconceptional period is recommended to reduce the risk of neural tube defects [8,9]. Thus, in many countries, women planning to become pregnant are advised to take this dosage of FAs, to avoid exceeding the tolerable upper limit of 1000  $\mu\text{g}/\text{day}$ , and to eat varied diets rich in dietary folate. In Spain, there is no information on FA status at national level, although in a population-based mother-child cohort study in Valencia, the periconceptional mean daily FA intake was 304  $\mu\text{g}$ , lower than the recommended dietary intake [10]. The proportion of women using FA supplements in preconception, the first month, and the second month of pregnancy was 19%, 30%, and 66% respectively; and among women using FA supplements in the periconceptional period, 30% exceeded the upper tolerable limit (UTL) for FAs of 1.000  $\mu\text{g}/\text{day}$  [10].

Recently published studies suggest that the use of FAs during pregnancy at doses below or above the present recommendations during the periconceptional period of pregnancy may cause changes in the fetal brain, which can alter the future child's cognitive and motor processes [11,12]. In fact, a deficient FAs use in pregnancy has been associated with poorer cognitive skills in children [13], and in our study over a half of pregnant women used low doses of FAs (<400  $\mu\text{g}/\text{day}$ , including no use) [14]. Moreover, one-third of the pregnant women in our study used high FAs doses above 1000  $\mu\text{g}/\text{day}$  (3.5% consuming >5000  $\mu\text{g}/\text{day}$ ), which has been also related to psychomotor delay at one year of age [15], and cognitive deficits at 4–5 years of age [16], especially in verbal function. In this sense, early childhood and preschool age are appropriate periods to investigate the potential cognitive effects of the use of FAs, since the prefrontal cortex, the brain area related to superior cognitive functions, achieves its synaptic formation peak at the age of 4 years, approximately [17,18].

The negative effects of low or high of FAs doses on cognitive function have been also shown in an animal studies with mice models. In one study, three type of diets were used: one group containing no FA (low doses), another group with high doses of FA (20 mg/kg), and a control group with the recommended doses (2 mg/kg). Compared to offspring from the control group, those from the low and high doses groups presented structural and physiological neurodevelopmental abnormalities such as thinner cortex, persistent deviation in cortical cytoarchitectural organization, less complex dendritic arbors (which could be related to neuronal dysfunction [19], delay in prenatal neurogenesis, and an increased apoptosis in the developing cortex. In addition, compared to mice exposed to

recommended doses, the FA-deficient offspring underperformed in memory tests and the exposed to high FA doses showed an increased open space-induced anxiety [20].

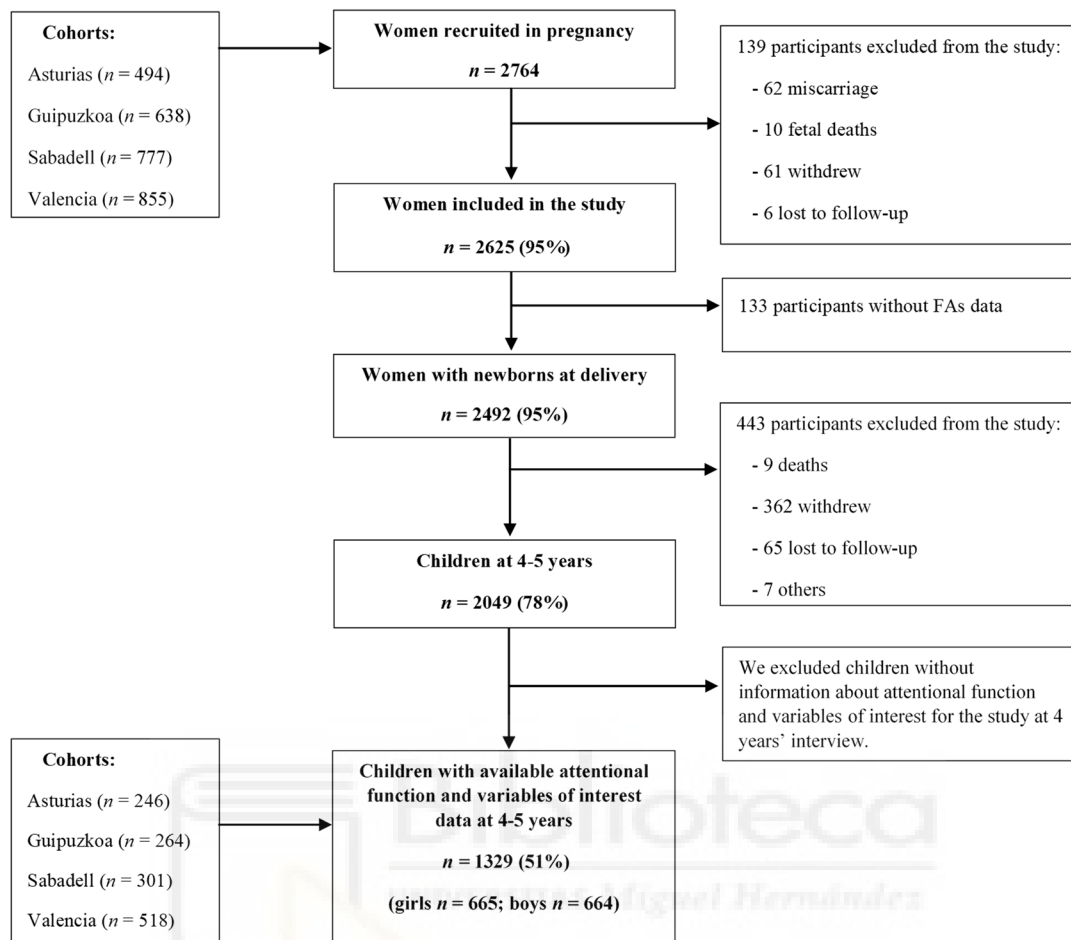
Nevertheless, little is still known regarding the effect of high or low FAs doses in children's attentional function. Attentional function is crucial to children's social relations and learning [21]. It is a superior cognitive function, which involves different processes, such as focus on a specific stimulus during a period of time to process it adequately, while ignoring other stimuli from the environment [22]. Their development begins in the embryonic period, in which the brain is very vulnerable to environmental factors such as the mother's diet [23,24], and it continues until adolescence [25,26]. A recently published review [27] describes the importance of the maternal use of FAs at recommended doses in order to reduce inattention symptoms in school-age children and improve attention and concentration in adolescents. Thus, our hypothesis is that the use of lower (<400 µg/day) or higher (≥1000 µg/day) doses of FAs during pregnancy compared to the recommended use (400–999 µg/day) may produce attentional dysfunction in children at 4–5 years of age. Therefore, we aim to evaluate the association between the use of FAs at doses below or above the recommended in pregnancy and attentional function in children at 4–5 years of age.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design and Population

The INMA—Infancia y Medio Ambiente [Environment and Childhood] Project—is a population-based prospective birth cohort study, established in seven regions of Spain following a common protocol [28]. In the current study, we used the data collected from the INMA regions of Valencia, Sabadell (Catalonia), Asturias, and Gipuzkoa (Basque-country). These four cohorts were established between 2003 and 2008. Detailed information on the population and study design has been published elsewhere [28]. Briefly, participants were recruited during the first prenatal visit, between weeks 10 and 13 of gestation at public primary health care centers or public hospitals. Women who agreed to participate were followed up at the third trimester of gestation; delivery; when children were 1 year of age; and at 4–5 years of age. Of the available 2764 women, 139 women were excluded from the study due to withdrawal, being unavailable for follow-up, induced or spontaneous abortions, or fetal deaths. A total of 2625 women delivered a live infant between May 2004 and August 2008, and 2049 children participated at the 4-year follow-up assessment. Finally, for the present study, 1329 mother-child pairs were included with available data on the main variables when children were aged 4 to 5. Figure 1 shows the flowchart of the population sample in our study. The final analysis was based on 1329 children since the attentional function assessment was introduced late in the 4–5 years follow-up. All participants gave informed written consent in each phase of the study prior to participation, and the Institutional Ethical Committees of the participating centres involved in the study approved the research protocol (CEIC-Hospital La Fe, Valencia; CEIC-Hospital de Zumárraga, Gipuzkoa; CEIC-Parc de Salut Mar, Barcelona; CEIC-Hospital Universitario Central de Asturias).





**Figure 1.** Flowchart of the study population describing the selection process.

## 2.2. Dietary Folate and FAs Intake during Pregnancy

The assessment of dietary folate and FAs intake has been described previously [15,29] (available at: <http://epinut.edu.umh.es/cfa-101-inma-embarazadas/>). Briefly, validated food frequency questionnaires (FFQs) [30] were administered to pregnant women at 10–13 and 28–32 weeks to estimate dietary intakes from three months preconception to the third month of pregnancy, and from the fourth to the seventh month of pregnancy, respectively. The folate content of food was primarily obtained from USDA food composition tables [31] and other Spanish-published sources [32]. In the present study, we estimated the typical dietary folate intake for the periconceptional period, for the second–third trimester of pregnancy, and for the average of these two periods combined (entire pregnancy).

The consumption of FAs or vitamin and mineral preparations containing FAs were obtained through specific supplement questions of the FFQ. FAs use was estimated based on daily dose, supplement brand name and composition, and duration of consumption for each period of pregnancy. We estimated the monthly use of FAs and the average for each woman in periconceptional period, the second period of pregnancy, and during the entire pregnancy. After that, we categorized the use of FAs in these periods as <400 µg/day, 400–999 µg/day (this was used as the reference category in the analyses), and ≥1000 µg/day, similarly as we have done in previous work [16].

## 2.3. Children's Attentional Function Assessment

Attentional function was measured at the median age of 4.6 years using Conner's Kiddie Continuous Performance Test (K-CPT) [33] although in Valencia, the median age of children was 5.8 years. The K-CPT (K-CPT TM v.5) is a 7.5-min computerized test

that examines inattention, impulsivity, sustained attention, and vigilance in children aged 4 to 7 years [34]. This test was administered to children individually in a quiet room by trained fieldworkers. Children were instructed to press the space bar on the keyboard as fast as possible when they saw an image on the computer screen (the target), unless that image was a ball (the non-target). The main five interest measures of the K-CPT included (Table S1): omission errors (i.e., the number of times the child did not respond to a target); commission errors (i.e., the number of times the child responded erroneously to a non-target); hit reaction time (HRT, the mean response time—expressed in milliseconds—for all correct responses during the entire test); standard error of the hit reaction time [HRT(SE)]; the within-child variability of the HRTs, which is a measure of speed response consistency—expressed in milliseconds—throughout the test [35], and finally, the detectability of attentiveness ( $d'$ , a measure—without units—which shows the children's capacity to distinguish a target from a non-target stimulus [33,36]). Higher scores in the K-CPT outcomes mean adverse attention results, with the exception of detectability.

#### 2.4. Other Variables

Information on potential confounders were obtained from questionnaires completed at the personal interview in pregnancy. These questionnaires included information on sociodemographic and lifestyle factors such as: mother's characteristics (location (Asturias; Gipuzkoa; Sabadell; Valencia), age (in years), energy intake (in kilocalories), social class (I + II [high], III [medium], or IV + V [low]), educational level (primary or less, secondary, or university), parity (0 or  $\geq 1$ ), overall tobacco exposition (yes/no), BMI pre-pregnancy (continuous)); father's BMI (continuous); and child's characteristics (sex (male, female) and age at K-CPT examination (in years)).

#### 2.5. Statistical Analysis

Descriptive analysis of sociodemographic, lifestyle, and obstetric characteristics of pregnant women was performed for the four areas of the INMA project. To explore the normal distribution of the quantitative variables, we used the Kolmogorov test. Moreover, we used the Chi-square test for qualitative variables and the Kruskal-Wallis test for quantitative variables.

All the covariates with  $p$  value  $>0.20$  in bivariate analysis and those that changed the magnitude of the main effects by  $>10\%$  after a backward elimination procedure were included in the core model. Multiple robust linear regression models using an MM-type estimator was performed to evaluate the association between FAs use and K-CPT outcomes (HRT, HRT (SE), and detectability) for each pregnancy period: the periconceptual period, second period of pregnancy, and throughout the entire pregnancy [37]. Multiple negative binomial regression models were used to estimate associations between FAs use and K-CPT count outcomes (number of omission errors and number of commission errors) for each period of pregnancy [38]. The regressions coefficients of negative binomial models were exponentiation to obtain IRR (incidence rate ratios) which should be interpreted as relative risk. Besides this, to obtain combined estimates for the four study cohorts, we used a meta-analysis. Heterogeneity was quantified with the  $I^2$  statistic under the fixed-effects hypothesis ( $I^2 \leq 50\%$ ), and when heterogeneity was detected ( $I^2 > 50\%$ ), the random effects model was used [39]. To verify potential effect modification, additional models stratified by sex of the children were run.

Sensitivity analysis was performed to analyze the robustness of the main findings. We added mother or child conditions that could be related to child cognitive function development as a different adjustment to the basal model. So, we included in the basal model maternal variables such as iodine intake from supplements; fish consumption during pregnancy; verbal reasoning outcome of the similarities subtest of the Wechsler Adult Intelligence Scale-III; time of initiating FAs usage;  $\text{NO}_2$  exposition during pregnancy; and use of acetaminophen during pregnancy. In addition, we ran the basal model with child variables such as dietary folate intake assessed by validated FFQ. Finally, to avoid any potential

influence in the association, we conducted the basal model after excluding subjects with some conditions such as preterm deliveries ( $n = 1273$ ), mothers with medical conditions that could affect the typical development of cognitive functions (diabetes mellitus, epilepsy, or thyroid disease) ( $n = 1079$ ), mothers who did not use FAs throughout their entire pregnancies ( $n = 1258$ ), children who met the WHO obesity criteria (97th percentile) ( $n = 1192$ ), children with psychomotor delay on the Bayley Scales of Infant and Toddler development (BSID) at age 1 year (<85th percentile) ( $n = 1207$ ), and children with low scores in executive function on the McCarthy Scales of Children's Abilities (MSCA) (<76.3 score) ( $n = 1248$ ). We also performed sensitivity analyses stratifying by boys and girls.

Statistical analyses were conducted with R 3.4.2 (R Foundation for Statistical Computing).

### 3. Results

The baseline characteristics of the pregnant women and their children according to the four areas of the study are shown in Table 1. Overall, the median age of the mothers was 31 years, more than a third (36.3%) had completed university studies, and almost half of them (48.8%) had low social class.

**Table 1.** Socio-demographic, lifestyle, and obstetric characteristics of parents and children at four years, 2003.

	All Cohorts ( $n = 1329$ )	Valencia ( $n = 518$ )	Sabadell ( $n = 301$ )	Asturias ( $n = 246$ )	Gipuzkoa ( $n = 264$ )	$p^1$
Mother's age, year	31 (28–34)	30 (28–33)	31 (28–34)	31 (29–35)	31 (29–33)	<0.001
Educational level						
Primary or less	285 (21.4)	144 (27.8)	73 (24.3)	40 (16.3)	28 (10.6)	<0.001
Secondary	561 (42.2)	226 (43.6)	121 (40.2)	111 (45.1)	103 (39.0)	
University	483 (36.3)	148 (28.6)	107 (35.5)	95 (38.6)	133 (50.4)	
Social class						
I + II (high)	312 (23.5)	99 (19.1)	70 (23.3)	60 (24.4)	83 (31.4)	<0.001
III	368 (27.7)	138 (26.6)	100 (33.2)	56 (22.8)	74 (28.0)	
IV + V (low)	649 (48.8)	281 (54.2)	131 (43.5)	130 (52.8)	107 (40.5)	
Parity $\geq 1$	564 (42.4)	234 (45.2)	129 (42.9)	92 (37.4)	109 (41.3)	0.230
Overall tobacco exposition during pregnancy, yes	810 (61.0)	370 (71.4)	179 (59.5)	108 (43.9)	153 (58.0)	<0.001
Missing values	26 (1.3)	6 (1.2)	6 (2.0)	12 (4.9)	2 (0.8)	
Prepregnancy mother's BMI, $\text{kg}/\text{m}^2$						
<18.5–25	982 (73.9)	368 (71.0)	232 (77.1)	172 (69.9)	210 (79.5)	0.045
>25–30	251 (18.9)	103 (19.9)	50 (16.6)	58 (23.6)	40 (15.2)	
>30	96 (7.2)	47 (9.1)	19 (6.3)	16 (6.5)	14 (5.3)	
Prepregnancy father's BMI, $\text{kg}/\text{m}^2$						
<18.5–25	569 (42.8)	226 (43.6)	142 (47.2)	75 (30.5)	126 (47.7)	<0.001
>25–30	574 (43.2)	233 (45.0)	112 (37.2)	120 (48.8)	109 (41.3)	
>30	164 (12.5)	59 (11.4)	43 (14.3)	42 (17.1)	20 (7.6)	
Missing values	22 (1.7)	0 (0.0)	4 (1.3)	9 (3.7)	9 (3.4)	
Child's sex, male	664 (50.0)	267 (51.5)	153 (50.8)	121 (49.2)	123 (46.6)	0.600
Child's sex, female	665 (50.0)	251 (48.5)	148 (49.2)	125 (50.8)	141 (53.4)	
Age at K-CPT examination, year	4.6 (4.4–5.7)	5.8 (5.7–5.8)	4.5 (4.4–4.6)	4.4 (4.3–4.5)	4.5 (4.4–4.5)	<0.001
Dietary folate, $\mu\text{g}/\text{day}$						
First period	294 (237–359)	294 (234–360)	282 (231–343)	312 (245–370)	307 (246–365)	0.003
Second period	291 (235–358)	278 (220–353)	289 (233–348)	300 (242–365)	302 (259–369)	<0.001
FAs $\mu\text{g}/\text{day}$						
First period						
<400	742 (55.8)	309 (59.7)	190 (63.1)	112 (45.5)	131 (49.6)	<0.001
400–999	199 (15.0)	80 (15.4)	35 (11.6)	42 (17.1)	42 (15.9)	
$\geq 1000$	388 (29.2)	129 (24.9)	76 (25.2)	92 (37.4)	91 (34.5)	

Table 1. Cont.

	All Cohorts ( <i>n</i> = 1329)	Valencia ( <i>n</i> = 518)	Sabadell ( <i>n</i> = 301)	Asturias ( <i>n</i> = 246)	Gipuzkoa ( <i>n</i> = 264)	<i>p</i> <sup>1</sup>
Second period						
<400	683 (51.4)	169 (32.6)	252 (83.7)	66 (26.8)	196 (74.2)	<0.001
400–999	405 (30.5)	246 (47.5)	35 (11.6)	88 (35.8)	36 (13.6)	
≥1000	241 (18.1)	103 (19.9)	14 (4.7)	92 (37.4)	32 (12.1)	
K-CPT outcomes						
HRT, ms	705 (633–792)	669 (604–735)	718 (647–803)	758 (678–843)	733 (659–845)	<0.001
HRT(SE), ms	28 (20.6–37.9)	22.9 (17.2–30.7)	32.6 (24.7–43.6)	31.6 (24.1–40.0)	31.3 (22.9–41.6)	<0.001
Detectability, no unit	0.6 (0.3–0.9)	0.5 (0.3–0.8)	0.5 (0.3–0.8)	0.7 (0.3–1.0)	0.6 (0.3–0.9)	0.011
Omissions, number	18 (9–34)	10 (5–20.75)	24 (13–37)	23 (13–37.75)	31 (16.75–50)	<0.001
Commissions, number	21 (13–29)	22 (15–29)	22 (15–31)	16.5 (10–30.75)	18 (11–28)	<0.001

First period, periconceptual period of pregnancy; second period, from the fourth to the seventh month of pregnancy; FAs, folic acid supplement; HRT, hit reaction time (ms); HRT(SE), hit reaction time standard error (ms); INMA, Infancia y Medio Ambiente; K-CPT, Conners' Kiddie Continuous Performance Test; ms, milliseconds; num, number. Values are medians (IQRs) for mother's age, age at K-CPT examination, dietary folate, and K-CPT outcomes; and values are *n* (%) for the rest of variables. <sup>1</sup> *p* values of differences between study cohorts from the Chi-square test (categorical variables) and Kruskal-Wallis test (continuous nonparametric variables).

A total of 55.8% of the mothers used <400 µg/day FAs doses and 29.2% used ≥1000 µg/day FAs doses in the periconceptual period. In this period, the highest proportion of pregnant women taking <400 µg/day FAs doses were from Sabadell (63.1%), while the highest proportion of pregnant women taking ≥1000 µg/day FAs doses were from Asturias (37.4%) ( $\chi^2 = 26.986$ , 6 d.f.,  $p = 0.00014$ ). In the second period of pregnancy, 51.4 and 18.1% of the mothers used doses of <400 µg/day and ≥1000 µg/day FAs, respectively. In this period, an important proportion of mothers from Valencia (19.9%) and Asturias (37.4%) continued taking ≥1000 µg/day FAs doses ( $\chi^2 = 350.2$ , 6 d.f.,  $p < 0.0000002$ ) (Table 1). Children from Valencia showed lower results in most KCP-T outcomes compared to children from other study areas, although they showed the highest scores in the number of commission errors together with children from the Sabadell area (Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 24.823$ , 3 d.f.,  $p = 0.000016$ ) (Table 1).

Table 2 presents the fully-adjusted models with the combined associations between use of FAs and K-CPT outcomes in the different periods of pregnancy. Compared to the periconceptual use of recommended FAs doses (400–999 µg/day), the periconceptual FAs use of <400 µg/day and ≥1000 µg/day was associated with a 14% (IRR = 1.14; 95% CI = 1.01 to 1.29) and 16% (IRR = 1.16; 95% CI = 1.02 to 1.33) of increase in the number of children's omission errors, respectively. The associations between the periconceptual use of non-recommended FAs doses and the number of omission errors in each area of study were similar to the combined results, but in the Valencia area the number of associations was slightly higher and reached statistical significance (Figure 2). There were no statistically significant associations in other K-CPT outcomes or in other periods of pregnancy. We explored the interactions between overall tobacco exposition and the use of FAs during the periconceptual period but none were significant.

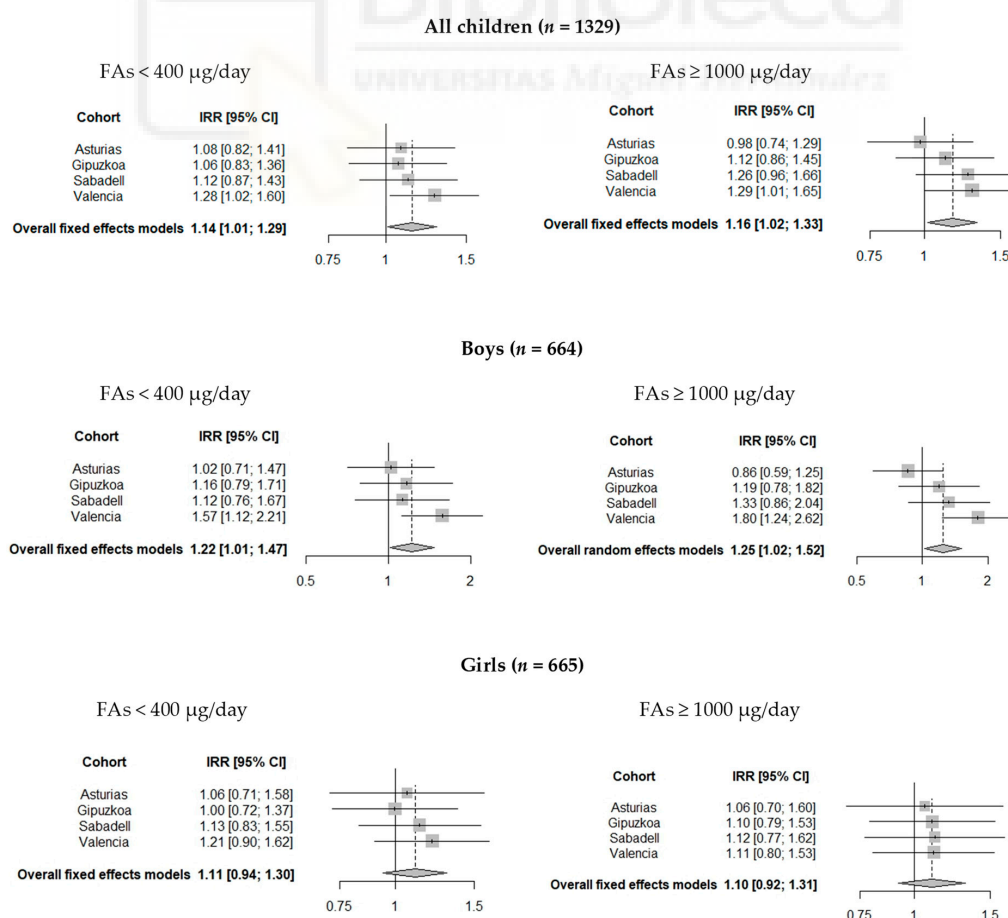
When the analysis was stratified by sex, the positive association found between periconceptual FAs use of <400 µg/d and the increased number of omission errors was only observed in boys (IRR = 1.22; 95% CI = 1.01 to 1.47), this FAs use was also associated with a higher HRT in boys ( $\beta = 34.36$ ; 95% CI = 10.01 to 58.71) (Figure 2). In addition, the periconceptual FAs use of ≥1000 µg/day was associated with a higher HRT in boys ( $\beta = 33.18$ ; 95% CI = 6.10 to 60.25) and a higher HRT (SE) ( $\beta = 3.31$ ; 95% CI = 0.53 to 6.09). In girls, we only observed a protective association between the FAs use of <400 µg/day during the second period of pregnancy and decreased number of omission errors (IRR = 0.86; 95% CI = 0.74 to 1.00) (Table 3). The combined associations between non-recommended FAs doses and boys' and girls' attentional function outcomes were similar to those observed by cohort. Omission errors and HRT(SE) associations found in boys were slightly higher

and reached statistical significance only in the Valencia area, whereas the HRT association found in boys reached statistical significance only in the Gipuzkoa area (Figure 3).

**Table 2.** Fully-adjusted combined association between folic acid supplement (FAs) use during pregnancy and attentional function outcomes in children aged 4–5 years of the Infancia y Medio Ambiente (INMA) cohort study, Spain, 2003–2008 (*n* = 1329).

	HRT			HRT(SE)			Detectability			Omissions			Commissions		
	$\beta^1$ (95% CI)	<i>p</i>	<i>I</i> <sup>2</sup>	$\beta^1$ (95% CI)	<i>p</i>	<i>I</i> <sup>2</sup>	$\beta^1$ (95% CI)	<i>p</i>	<i>I</i> <sup>2</sup>	IRR <sup>1</sup> (95% CI)	<i>p</i>	<i>I</i> <sup>2</sup>	IRR <sup>1</sup> (95% CI)	<i>p</i>	<i>I</i> <sup>2</sup>
First period FAs, $\mu\text{g}/\text{day}$ 400–999	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
<400	14.56 (−3.26; 32.38)	0.109	0.0	1.01 (−0.69; 2.70)	0.244	0.0	0.03 (−0.11; 0.16)	0.685	75.5	1.14 (1.01; 1.29)	0.035	0.0	0.96 (0.83; 1.12)	0.633	66.1
$\geq 1000$	9.06 (−11.02; 29.14)	0.376	0.0	1.73 (−0.13; 3.60)	0.068	0.0	−0.00 (−0.16; 0.15)	0.986	79.0	1.16 (1.02; 1.33)	0.027	0.0	0.99 (0.83; 1.19)	0.941	72.3
Second period FAs, $\mu\text{g}/\text{day}$ 400–999	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
<400	3.80 (−11.23; 18.83)	0.620	0.0	−1.25 (−2.70; 0.21)	0.094	9.3	0.02 (−0.04; 0.08)	0.455	0.0	0.91 (0.82; 1.02)	0.097	0.0	0.97 (0.91; 1.04)	0.426	0.0
$\geq 1000$	−1.39 (−21.45; 18.67)	0.892	0.0	0.41 (−3.25; 4.07)	0.825	52.7	−0.02 (−0.09; 0.05)	0.568	0.0	1.02 (0.90; 1.16)	0.773	6.3	1.03 (0.95; 1.12)	0.442	0.0
Entire pregnancy FAs, $\mu\text{g}/\text{day}$ 400–999	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
<400	−9.52 (−38.06; 19.02)	0.513	52.4	−0.41 (−1.98; 1.16)	0.607	22.0	−0.03 (−0.20; 0.15)	0.775	86.9	0.95 (0.77; 1.17)	0.624	70.0	1.05 (0.85; 1.29)	0.666	83.9
$\geq 1000$	−10.94 (−30.28; 8.41)	0.268	1.0	−0.07 (−1.83; 1.69)	0.934	41.1	−0.01 (−0.17; 0.14)	0.894	76.9	0.98 (0.80; 1.19)	0.838	56.8	1.02 (0.83; 1.26)	0.826	79.1

First period, periconceptual period of pregnancy; second period, from the fourth to the seventh month of pregnancy; FAs, folic acid supplements; INMA, Infancia y Medio Ambiente; HRT, hit reaction time (ms); HRT(SE), hit reaction time standard error (ms); omissions, omission errors (n); commission, commission errors (n);  $\beta$ , beta coefficient from multiple robust linear regression; 95% CI, 95% confidence interval; *I*<sup>2</sup>, index to quantify the degree of heterogeneity in a meta-analysis; IRR, incidence rate ratio from negative binomial regression. <sup>1</sup> Cohort-specific models were combined using meta-analysis. All models were adjusted by energy intake (in kilocalories), dietary folate intake per 100  $\mu\text{g}/\text{day}$  increase, social class (I + II (high), III or IV + V (low)), educational level (primary or less, secondary or university), parity (0 or  $\geq 1$ ), overall tobacco exposure during the periconceptual period (no or yes), mother’s age (in years), mother’s BMI (continuous), father’s BMI (continuous), child’s sex and child’s age at K-CPT examination (in years). We used the results from the fixed-effects meta-analysis model when *I*<sup>2</sup> was less than 50% and from the random-effects meta-analysis model when *I*<sup>2</sup> was greater than 50%.



**Figure 2.** Pooled estimates of the associations between FAs (<400 and  $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{day}$  compared to 400–999  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) and number of omission errors during periconceptual period of pregnancy in all children, boys, and girls at 4–5 years of age.

**Table 3.** Fully-adjusted combined association between FAs use during pregnancy and attentional function outcomes in children aged 4–5 years of the INMA cohort study according to sex; Spain, 2003–2008 (*n* boys = 664; *n* girls = 665).

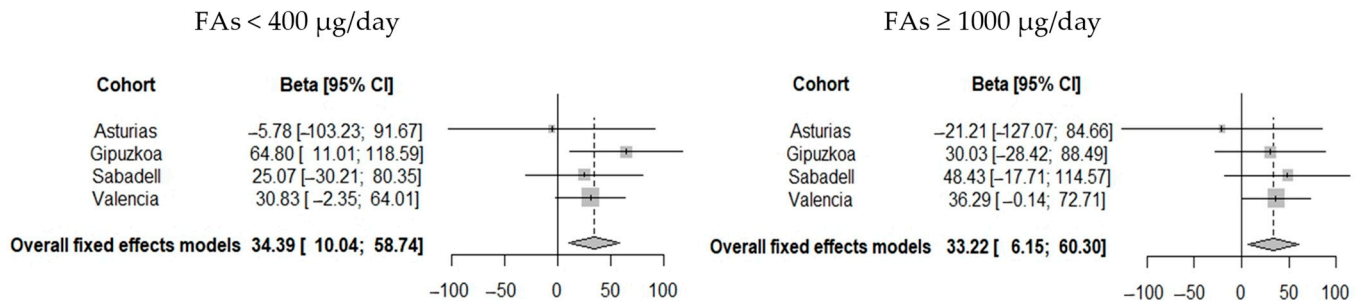
	HRT			HRT(SE)			Detectability			Omissions			Commissions		
	$\beta^1$ (95% CI)	<i>p</i>	<i>I</i> <sup>2</sup>	$\beta^1$ (95% CI)	<i>p</i>	<i>I</i> <sup>2</sup>	$\beta^1$ (95% CI)	<i>p</i>	<i>I</i> <sup>2</sup>	IRR <sup>1</sup> (95% CI)	<i>p</i>	<i>I</i> <sup>2</sup>	IRR <sup>1</sup> (95% CI)	<i>p</i>	<i>I</i> <sup>2</sup>
<b>BOYS</b>															
First period FAs, $\mu\text{g/day}$ 400–999	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
<400	34.36 (10.01; 58.71)	0.006	0.0	2.02 (−0.56; 4.59)	0.124	0.0	0.05 (−0.03; 0.14)	0.202	16.5	1.22 (1.01; 1.47)	0.036	8.6	0.92 (0.83; 1.03)	0.153	0.0
$\geq 1000$	33.18 (6.10; 60.25)	0.016	0.0	3.31 (0.53; 6.09)	0.019	3.7	0.04 (−0.05; 0.13)	0.395	44.8	1.25 (0.91; 1.72)	0.169	60.9	0.97 (0.80; 1.18)	0.752	57.4
Second period FAs, $\mu\text{g/day}$ 400–999	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
<400	−1.96 (−22.06; 18.13)	0.848	0.0	−2.15 (−4.47; 0.17)	0.069	0.0	0.06 (−0.10; 0.22)	0.490	65.3	0.92 (0.78; 1.09)	0.346	0.0	1.00 (0.91; 1.09)	0.919	37.1
$\geq 1000$	−6.03 (−57.93; 45.87)	0.820	54.6	1.01 (−1.76; 3.79)	0.474	15.2	−0.07 (−0.15; 0.02)	0.121	9.2	0.96 (0.80; 1.16)	0.687	0.0	1.10 (0.99; 1.23)	0.072	49.4
Entire pregnancy FAs, $\mu\text{g/day}$ 400–999	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
<400	−19.19 (−56.07; 17.69)	0.308	53.2	−0.72 (−2.99; 1.56)	0.537	0.0	−0.06 (−0.20; 0.09)	0.450	61.4	0.95 (0.70; 1.27)	0.713	71.7	1.07 (0.92; 1.25)	0.405	58.2
$\geq 1000$	−21.48 (−47.27; 4.30)	0.102	0.0	−0.11 (−2.68; 2.46)	0.935	47.9	−0.05 (−0.19; 0.10)	0.521	51.6	1.00 (0.73; 1.37)	1.000	68.0	1.05 (0.84; 1.30)	0.686	71.4
<b>GIRLS</b>															
First period FAs, $\mu\text{g/day}$ 400–999	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
<400	6.20 (−20.88; 25.53)	0.654	0.0	0.70 (−1.82; 3.22)	0.586	0.0	0.04 (−0.17; 0.26)	0.688	77.8	1.11 (0.94; 1.30)	0.227	0.0	0.98 (0.75; 1.27)	0.855	76.0
$\geq 1000$	−4.77 (−35.07; 25.53)	0.758	0.0	0.38 (−2.44; 3.20)	0.791	0.0	0.00 (−0.15; 0.15)	0.998	50.3	1.10 (0.92; 1.31)	0.302	0.0	0.99 (0.87; 1.13)	0.847	39.6
Second period FAs, $\mu\text{g/day}$ 400–999	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
<400	13.04 (−9.90; 35.98)	0.265	0.0	−0.65 (−2.52; 1.21)	0.493	20.8	0.04 (−0.04; 0.12)	0.357	0.0	0.86 (0.74; 1.00)	0.045	0.9	0.95 (0.86; 1.06)	0.358	5.3
$\geq 1000$	−4.36 (−34.59; 25.86)	0.777	0.0	−0.65 (−3.46; 2.17)	0.654	29.3	0.03 (−0.07; 0.13)	0.534	0.0	1.02 (0.86; 1.22)	0.792	0.0	0.97 (0.86; 1.11)	0.669	0.0
Entire pregnancy FAs, $\mu\text{g/day}$ 400–999	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
<400	10.59 (−15.21; 36.40)	0.421	0.1	0.28 (−2.14; 2.69)	0.822	0.0	0.03 (−0.19; 0.25)	0.774	80.0	1.00 (0.85; 1.18)	0.976	0.0	1.03 (0.87; 1.10)	0.837	79.5
$\geq 1000$	−3.07 (−32.22; 26.08)	0.837	22.4	−0.18 (−2.83; 2.48)	0.896	0.0	0.03 (−0.13; 0.20)	0.710	52.6	0.97 (0.81; 1.17)	0.772	0.0	1.00 (0.80; 1.27)	0.937	53.8

First period, periconceptional period of pregnancy; second period, from the fourth to the seventh month of pregnancy; FAs, folic acid supplements; INMA, Infancia y Medio Ambiente; HRT, hit reaction time (ms); HRT(SE), hit reaction time standard error (ms); omissions, omission errors (n); commission, commission errors (n);  $\beta$ , beta coefficient from multiple robust linear regression; 95% CI, 95% confidence interval; *I*<sup>2</sup>, index to quantify the degree of heterogeneity in a meta-analysis; IRR, incidence-rate ratio from negative binomial regression.  
<sup>1</sup> Cohort-specific models were combined using meta-analysis. All models were adjusted by energy intake (in kilocalories), dietary folate intake per 100  $\mu\text{g/day}$  increase, social class (I + II (high), III or IV + V (low)), educational level (primary or less, secondary or university), parity (0 or  $\geq 1$ ), overall tobacco exposition during the periconceptional period (no or yes), mother’s age (in years), mother’s BMI (continuous), father’s BMI (continuous), and child’s age at K-CPT examination (in years). We used the results from the fixed-effects meta-analysis model when *I*<sup>2</sup> was less than 50% and from the random-effects meta-analysis model when *I*<sup>2</sup> was greater than 50%.

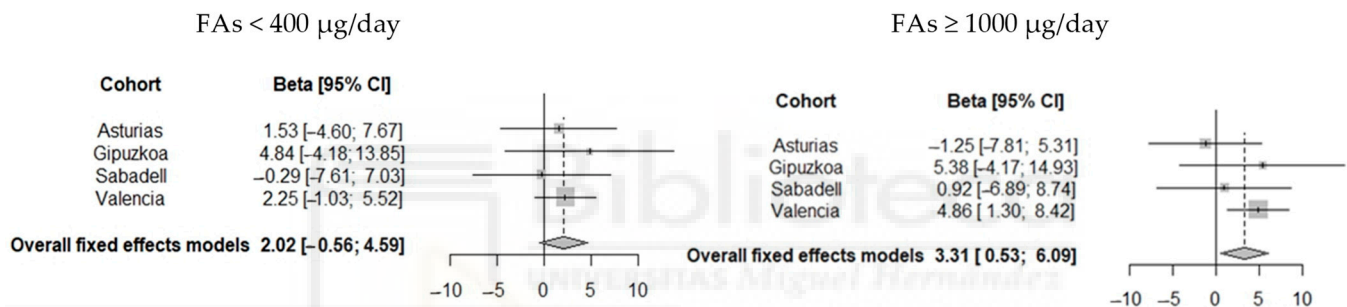
Sensitivity analyses were conducted to assess the robustness of the association between the periconceptional use of non-recommended FAs doses and the number of omission errors under a variety of scenarios in all children and by sex (Figure 4). In all children, the associations between FAs use of <400  $\mu\text{g/day}$  and the number of omission errors remained similar to the basal model (IRR = 1.14; 95% CI = 1.01 to 1.29), although we observed a stronger association when we adjusted for child dietary folate and energy intake (IRR = 1.17; 95% CI = 1.03 to 1.32) and when we excluded mothers with medical conditions (IRR = 1.19; 95% CI = 1.04 to 1.37). In addition, the association between the FAs use of  $\geq 1000 \mu\text{g/day}$  and omission errors in the basal model (IRR = 1.16; 95% CI = 1.02 to 1.33) became slightly stronger when we excluded those mothers with medical conditions (IRR = 1.20; 95% CI = 1.03 to 1.39). As with the all-children associations, associations between FAs use of <400  $\mu\text{g/day}$  and the number of omission errors in boys remained very similar to the basal model (IRR = 1.22; 95% CI = 1.01 to 1.47), although it became stronger when we adjusted for mother’s acetaminophen use during pregnancy (IRR = 1.24; 95% CI = 1.03 to 1.49) and when we excluded mothers with medical conditions (IRR = 1.26; 95% CI = 1.02 to 1.56). Finally, when we added other variables such as alcohol consumption in grams day or breastfeeding (no, <20 weeks, or  $\geq 20$  weeks) in multivariable models, the observed associations remained similar and still significant. Similarly, after excluding children with

missing values or scoring less than 7 in the Apgar test at 1 or 5 min after birth, the results were unchanged (data not shown).

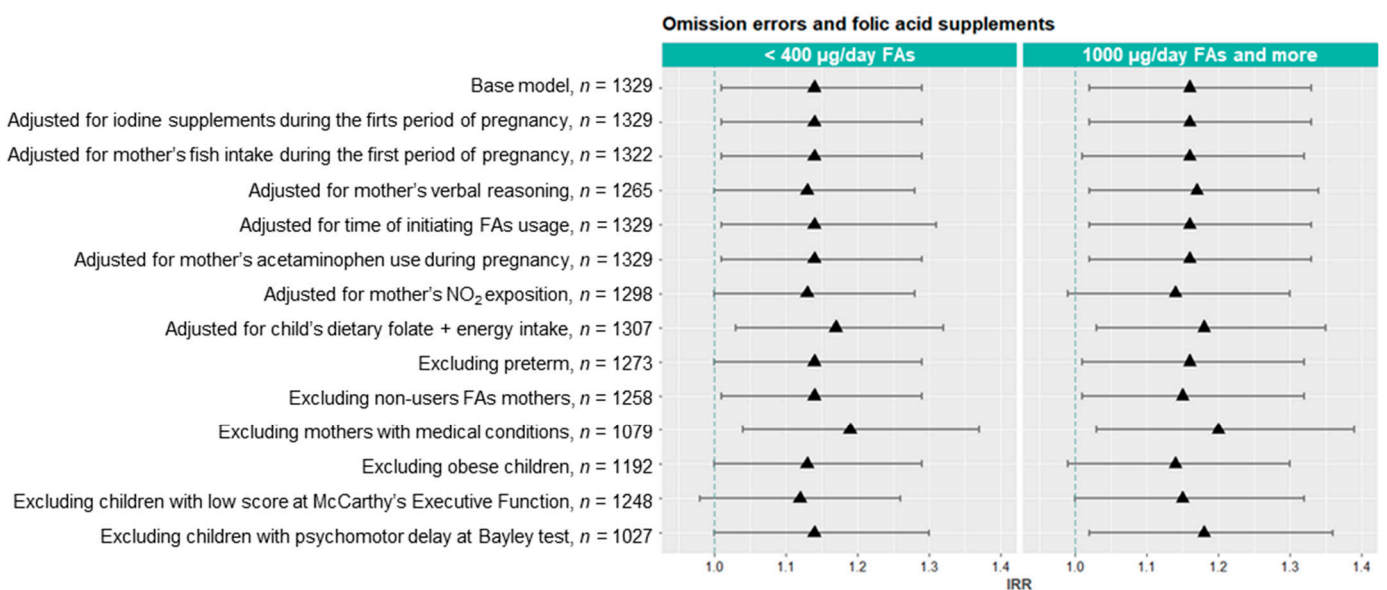
**Boys HRT (n = 664)**



**Boys HRT(SE) (n = 664)**



**Figure 3.** Pooled estimates of the associations between FAs (<400 and ≥1000 µg/day compared to 400–999 µg/day) and Conner’s Kiddie Continuous Performance Test (K-CPT) outcomes in boys at 4–5 years of age.



**Figure 4.** Sensitivity analyses of the associations between FAs use (<400 and ≥1000 µg/day compared to 400–999 µg/day) in the periconceptional period and number of omission errors in all children (n = 1329), girls (n = 665) and boys (n = 664) at 4–5 years.

#### 4. Discussion

In the present study, we found that, compared to the periconceptional use of the recommended FAs doses, the use of FAs doses  $<400$  or  $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{day}$  was associated with an increase in the number of omission errors in children at 4–5 years of age. Moreover, our results suggest that the association may be sex-specific, since only boys presented an increase in the number of omission errors with mothers taking  $<400$   $\mu\text{g}/\text{day}$  of FAs, and an increase of speed response consistency throughout the test (HRT(SE)) in mothers taking  $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{day}$ .

In our study, 266 out of 1329 children scored above the 80th percentile in the number of omission errors in the K-CPT assessment at the age of 5 years, which may be indicative of inattention. A prevalence of 18% of inattention in children of 5 years of age was found in a birth cohort study from United States [40]. In two birth cohorts in China, prevalences of 6.4% [41] and 12.3% [42] were reported for children 3 and 4 years old, respectively, although they evaluated the prevalence of Attention-Deficit-Hyperactivity Disorders (ADHD) while we evaluated only attentional function—just one of the ADHD symptoms. In another birth cohort study from Denmark, a prevalence of 30% was reported for children of 5 years [43]. Thus, it is difficult to make comparisons of inattention prevalence among studies since specific cut-off points or definitions for inattention are not used consistently yet.

To our knowledge, this is the first prospective study that suggests an increase in the number of omission errors in children aged 4–5 years with mothers taking non-recommended FAs doses ( $<400$  or  $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{day}$ ) compared to mothers taking recommended FAs doses (400–999  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) during the periconceptional period of pregnancy.

On the one hand, we found a negative effect of the periconceptional FAs use of  $<400$   $\mu\text{g}/\text{day}$  on children's attentional function at 4–5 years of age, specifically an increased number of omission errors, which is an indicative of inattentiveness [44]. This is a relevant finding that highlights the need to monitor the compliance of using the recommended FAs doses among pregnant women to avoid negative effects on the cognitive function of their children. The evidence evaluating the use of non-recommended FAs doses during pregnancy is very scarce due to ethical and moral commitments. Therefore, hypotheses like ours can only be evaluated in prospective birth cohort studies such as the INMA Project. In one birth cohort study with 420 children in Menorca, Julvez et al. [45] also showed a significant lower risk of inattention symptom at 4–5 years of age among women using periconceptional FAs. Similarly, del Río García et al. have shown that maternal dietary folate deficiency has been related to lower BSID mental scores in 253 Mexican infants [46]. This detrimental effect on attentional function could be related to the maternal folate deficiency that could affect early brain development [47], and result in a poorer offspring cognitive function [13]. In fact, a recently published study has shown higher apoptosis level in brain cells of mice offspring fed with a deficient FA diet [39], which could also affect offspring cognitive function.

On the other hand, we found a negative effect of the periconceptional FAs use of  $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{day}$  on children's attentional function at 4–5 years of age. In a similar way, negative effects on other domains of neurodevelopment have been reported in previous studies of the INMA project. Thus, an association between high periconceptional doses of FAs and negative effects on the development of offspring [15,16] has been reported, especially with negative effects on the cognitive development at age of 4–5 years [16]. These results have also been confirmed in animal studies. A growing number of animal researches have displayed that high doses of FAs has been associated with the presence of plasma unmetabolized FA producing alterations in the methylation pattern of several key developmental genes in offspring [48] and alterations in the expression of genes in the frontal cortex of offspring pups [49]. Considering that the frontal cortex is one of the most important parts of the brain related to attentional function, we could contemplate this as an explanation of the negative influence of high doses of FAs during periconceptional period on attentional function of children at 4–5 years of age. All of this evidence, including our results, offer safety concerns on the potential harmful effects of the use of high doses of



FAs throughout the whole life as described by Selhub and Rosenberg [50], particularly for children's cognitive function.

Moreover, we found sex differences in some attentional function outcomes. Boys of mothers using periconceptual FAs of  $<400$   $\mu\text{g}/\text{day}$  had increased omission errors and HRT, and boys of mothers using periconceptual FAs of  $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{day}$  had an increased speed response consistency throughout the test [HRT(SE)] and HRT compared to mothers using periconceptual recommended FAs doses. The associations found in girls are also negatives, but none reached statistical significance. Similarly, a recent study of INMA Project found sex differences on neuropsychological development at 4–5 years of age, being boys more vulnerable to prenatal pollutants exposure [51]. These results may indicate that boys are more vulnerable to a deficient periconceptual FAs use than girls. We did not find other studies that explore the effects of FAs use during pregnancy on neuropsychological development depending on the children's gender. However, a similar result in the KCP-T test was found in children participating in the Health Outcomes and Measures of the Environment (HOME) Study [52] in which omission errors were associated with executive difficulties only in boys at 5 years of age. Brain model system studies using image technologies could help us to understand the neurological basis of this sex difference in attentional function outcomes. A recent study analyzed sex and age-related brain changes in children and showed several differences between boys' and girls' brain development, including a higher connectivity in brain areas related to attentional function, namely superior and left orbitofrontal cortex, in boys compared to girls [53]. Furthermore, animal studies can partly explain these differences by the fact that sexual distinctions in brain neurodevelopment emerge during gestation, including the functional connectivity of the prefrontal cortex. During gestation, girls demonstrated a longer range of changes in functional connectivity in prefrontal cortex compared to boys; furthermore, this connectivity decreased as gestational age increased more pronouncedly in boys [54]. Consequently, it is possible that boys need a greater contribution of FAs during earlier stages of gestation than girls because it is the moment in which they present a greater connectivity, and therefore are more sensitive to low or high periconceptual FAs doses.

Finally, we observed stronger associations in the Valencia area between K-CPT outcomes (omission errors and HRT(SE)) in all children as well as in both boys and girls when we performed pooled estimates. These differences could be in part explained by the fact that children from Valencia were older than the children of the other areas of study at the K-CPT examination. In this sense, studies using magnetic resonance imaging (MRI) technology have described the functional connections in the whole brains of healthy children and found that numerous global network parameters showed significant increases with age [53] and a progressive functional maturation of attention brain allocation in adolescents [55].

This study has several limitations. We adjusted for a wide range of potential risk factors, although we cannot discard potential residual confounding due to not including potential confounding variables in the analyses, or bias due to subjects lost to follow up. However, mothers of children who performed the K-CPT assessment, presented practically equal age, educational, and socioeconomic statuses and FAs use, compared to those mothers who were excluded due to unavailability of data for K-CPT test. Moreover, estimates from self-reported supplementation may cause some misclassification, but any inaccuracy in reporting should be non-differential. In this sense, to classify women according to their FAs use, we used a FFQ which may be limited in estimating exact absolute values of folate intake, but it showed an acceptable reproducibility for folate intake ( $r = 0.48$ ) and biochemical validity ( $r = 0.53$ ) [30]. Finally, our results do not provide a possible explanation of the mechanisms by which the use of non-recommended doses of FAs during pregnancy could produce attentional dysfunction at 4–5 years of age. However, they can constitute an argument to future research in this field.

The major strengths of this study include a large sample size and a prospective design that minimized recall and selection bias. Additionally, we used a validated FFQ test to estimate FAs intake and a standardized and computerized battery for K-CPT to evaluate

attentional function, which may detect small changes on responses in children and provide objective assessment. Although not specifically validated, these tests were administrated by trainer interviewers which provided more unbiased assessment. Furthermore, the results from sensitivity analysis reinforced the consistency of these findings. Finally, the multicenter structure of the INMA Project showing different patterns of FAs use and the detailed information on the doses of FAs used at each period of pregnancy, including a crucial period of pregnancy, namely periconceptual period, may add value to our results.

## 5. Conclusions

In conclusion, this prospective mother–child cohort study shows that the periconceptual non-recommended FAs doses (<400 µg/day or ≥1000 µg/day) compared to the FAs use of 400–999 µg/day may have negative effects on attentional function development in children at 4–5 years of age. Furthermore, the use of non-recommended FAs doses could have different effects in girls and boys. Our findings add to existent evidence supporting a potential adverse effect of the use of non-recommended FAs doses, so we suggest not using these doses, unless medically prescribed. Nevertheless, additional studies are needed to confirm the associations found between non-recommended FAs doses and attentional function in children.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/2/327/s1>, Table S1: K-CPT outcomes description.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.V. and M.G.d.l.H.; formal analysis, L.M.C.G.; data curation, L.M.C.G. and M.G.d.l.H.; writing—original draft preparation, L.M.C.G.; writing—review and editing, L.T.C., A.F.-S., A.T., M.G., M.V., M.R., M.M., J.I., and I.M.; supervision, J.V. and M.G.d.l.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by grants from UE (FP7-ENV-2011 cod 282957 and HEALTH.2010.2.4.5-1); Spanish Institute of Health Carlos III-Ministry of Economy and Competitiveness (Red INMA G03/176, CB06/02/0041; FIS-FEDER: PI03/1615, PI04/1509, PI04/1112, PI04/1931, PI05/1079, PI05/1052, PI06/1213, PI06/0867, PI07/0314, PI09/02647, PI11/01007, PI11/02591, PI11/02038, PI12/00610, PI13/1944, PI13/2032, PI14/00891, PI14/01687, PI16/1288, PI17/00663, PI041436, PI081151, PI042018, PI09/02311, PI13/02429, PI18/00909, PI18/01142, PI09/00090, incl. FEDER funds; Miguel Servet-FEDER CP11/00178, CP15/00025, CPII16/00051 and CPII18/00018); Spanish Ministry of Science and Innovation and the State Research Agency (“Centro de Excelencia Severo Ochoa 2019-2023” Program CEX2018-000806-S); Generalitat Valenciana (FISABIO UGP 15-230, UGP-15-244, and UGP-15-249); Generalitat de Catalunya-CIRIT (1999SGR 00241 and support through the CERCA Program), ISGlobal is a member of the CERCA Program; Fundació La marató de TV3 (090430); CIBERESP; Obra Social Cajastur/Fundación Liberbank; Universidad de Oviedo; Alicia Koplowitz Foundation 2017; Department of Health of the Basque Government (2005111093); Department of Health of the Basque Government (2013111089); Provincial Government of Gipuzkoa (DFG06/002); annual agreements with the municipalities of the study area (Zumarraga, Urretxu, Legazpi, Azkoitia y Azpeitia y Beasain).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and the study protocol was approved by the Public Health Research Centre in Valencia (CSISP) and La Fe Hospital ethics committees of Valencia, Spain.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to confidentiality and ethical reasons.

**Acknowledgments:** We would like to acknowledge the English revision made by Jonathan Whitehead. We thank all the mothers and children participating in INMA study for their generous collaboration, and the field research for their work administering the questionnaires and collecting data.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Georgieff, M.K.; Brunette, K.E.; Tran, P.V. Early Life Nutrition and Neural Plasticity. *Dev. Psychopathol.* **2015**, *27*, 411–423. [CrossRef]
2. Fernstrom, J.D. Can Nutrient Supplements Modify Brain Function? *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 1669S–1673S. [CrossRef]
3. Mitchell, E.S.; Conus, N.; Kaput, J. B Vitamin Polymorphisms and Behavior: Evidence of Associations with Neurodevelopment, Depression, Schizophrenia, Bipolar Disorder and Cognitive Decline. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2014**, *47*, 307–320. [CrossRef]
4. Bailey, L.B.; Stover, P.J.; McNulty, H.; Fenech, M.F.; Gregory, J.F.; Mills, J.L.; Pfeiffer, C.M.; Fazili, Z.; Zhang, M.; Ueland, P.M.; et al. Biomarkers of Nutrition for Development-Folate Review. *J. Nutr.* **2015**, *145*, 1636S–1680S. [CrossRef]
5. Lassi, Z.S.; Salam, R.A.; Haider, B.A.; Bhutta, Z.A. Folic Acid Supplementation during Pregnancy for Maternal Health and Pregnancy Outcomes. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2013**. [CrossRef]
6. Desai, A.; Sequeira, J.M.; Quadros, E.V. The Metabolic Basis for Developmental Disorders Due to Defective Folate Transport. *Biochimie* **2016**, *126*, 31–42. [CrossRef] [PubMed]
7. Barua, S.; Kuizon, S.; Brown, W.T.; Junaid, M.A. High Gestational Folic Acid Supplementation Alters Expression of Imprinted and Candidate Autism Susceptibility Genes in a Sex-Specific Manner in Mouse Offspring. *J. Mol. Neurosci.* **2016**, *58*, 277–286. [CrossRef] [PubMed]
8. Prevention of Neural Tube Defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1677062/> (accessed on 14 December 2020).
9. Institute of Medicine (US). Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline. In *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*; The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health; National Academies Press (US): Washington, DC, USA, 1998; ISBN 978-0-309-06411-8.
10. Navarrete-Muñoz, E.M.; Giménez Monzó, D.; García de La Hera, M.; Climent, M.D.; Rebagliato, M.; Murcia, M.; Iñiguez, C.; Ballester, F.; Ramón, R.; Vioque, J. Folic acid intake from diet and supplements in a population of pregnant women in Valencia, Spain. *Med. Clin. (Barc.)* **2010**, *135*, 637–643. [CrossRef] [PubMed]
11. Caffrey, A.; McNulty, H.; Irwin, R.E.; Walsh, C.P.; Pentieva, K. Maternal Folate Nutrition and Offspring Health: Evidence and Current Controversies. *Proc. Nutr. Soc.* **2018**, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
12. Taylor, R.M.; Fealy, S.M.; Bisquera, A.; Smith, R.; Collins, C.E.; Evans, T.-J.; Hure, A.J. Effects of Nutritional Interventions during Pregnancy on Infant and Child Cognitive Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* **2017**, *9*, 1265. [CrossRef]
13. Veena, S.R.; Gale, C.R.; Krishnaveni, G.V.; Kehoe, S.H.; Srinivasan, K.; Fall, C.H. Association between Maternal Nutritional Status in Pregnancy and Offspring Cognitive Function during Childhood and Adolescence; a Systematic Review. *BMC Pregnancy Childbirth* **2016**, *16*, 220. [CrossRef]
14. Navarrete-Muñoz, E.M.; Valera-Gran, D.; García de la Hera, M.; Gimenez-Monzo, D.; Morales, E.; Julvez, J.; Riaño, I.; Tardón, A.; Ibarluzea, J.; Santa-Marina, L.; et al. Use of High Doses of Folic Acid Supplements in Pregnant Women in Spain: An INMA Cohort Study. *BMJ Open* **2015**, *5*, e009202. [CrossRef] [PubMed]
15. Valera-Gran, D.; García de la Hera, M.; Navarrete-Muñoz, E.M.; Fernandez-Somoano, A.; Tardón, A.; Julvez, J.; Forns, J.; Lertxundi, N.; Ibarluzea, J.M.; Murcia, M.; et al. Folic Acid Supplements during Pregnancy and Child Psychomotor Development after the First Year of Life. *JAMA Pediatr.* **2014**, *168*, e142611. [CrossRef] [PubMed]
16. Valera-Gran, D.; Navarrete-Muñoz, E.M.; Garcia de la Hera, M.; Fernández-Somoano, A.; Tardón, A.; Ibarluzea, J.; Balluerka, N.; Murcia, M.; González-Safont, L.; Romaguera, D.; et al. Effect of Maternal High Dosages of Folic Acid Supplements on Neurocognitive Development in Children at 4-5 y of Age: The Prospective Birth Cohort Infancia y Medio Ambiente (INMA) Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2017**, *106*, 878–887. [CrossRef] [PubMed]
17. Huttenlocher, P.R.; Dabholkar, A.S. Regional Differences in Synaptogenesis in Human Cerebral Cortex. *J. Comp. Neurol.* **1997**, *387*, 167–178. [CrossRef]
18. Tsujimoto, S. The Prefrontal Cortex: Functional Neural Development during Early Childhood. *Neuroscientist* **2008**, *14*, 345–358. [CrossRef] [PubMed]
19. Jan, Y.-N.; Jan, L.Y. Branching out: Mechanisms of Dendritic Arborization. *Nat. Rev. Neurosci.* **2010**, *11*, 316–328. [CrossRef]
20. Harlan De Crescenzo, A.; Panoutsopoulos, A.A.; Tat, L.; Schaaf, Z.; Racherla, S.; Henderson, L.; Leung, K.-Y.; Greene, N.D.E.; Green, R.; Zarbalis, K.S. Deficient or Excess Folic Acid Supply During Pregnancy Alter Cortical Neurodevelopment in Mouse Offspring. *Cereb. Cortex* **2021**, *31*, 635–649. [CrossRef]
21. Razza, R.A.; Martin, A.; Brooks-Gunn, J. Associations among Family Environment, Sustained Attention, and School Readiness for Low-Income Children. *Dev. Psychol.* **2010**, *46*, 1528–1542. [CrossRef]
22. White, R.F.; Campbell, R.; Echeverria, D.; Knox, S.S.; Janulewicz, P. Assessment of Neuropsychological Trajectories in Longitudinal Population-Based Studies of Children. *J. Epidemiol. Community Health* **2009**, *63*, i15–i26. [CrossRef]
23. Prado, E.L.; Dewey, K.G. Nutrition and Brain Development in Early Life. *Nutr. Rev.* **2014**, *72*, 267–284. [CrossRef] [PubMed]

24. Rosales, F.J.; Reznick, J.S.; Zeisel, S.H. Understanding the Role of Nutrition in the Brain and Behavioral Development of Toddlers and Preschool Children: Identifying and Addressing Methodological Barriers. *Nutr. Neurosci.* **2009**, *12*, 190–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bryan, J.; Osendarp, S.; Hughes, D.; Calvaresi, E.; Baghurst, K.; Van Klinken, J.-W. Nutrients for Cognitive Development in School-Aged Children. *Nutr. Rev.* **2004**, *62*, 295–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Rueda, M.; Pozuelos, J.; Cómbita, L. Cognitive Neuroscience of Attention From Brain Mechanisms to Individual Differences in Efficiency. *AIMS Neurosci.* **2015**, *2*, 183–202. [[CrossRef](#)]
27. Naninck, E.F.G.; Stijger, P.C.; Brouwer-Brolsma, E.M. The Importance of Maternal Folate Status for Brain Development and Function of Offspring. *Adv. Nutr.* **2019**, *10*, 502–519. [[CrossRef](#)]
28. Guxens, M.; Ballester, F.; Espada, M.; Fernández, M.F.; Grimalt, J.O.; Ibarluzea, J.; Olea, N.; Rebagliato, M.; Tardón, A.; Torrent, M.; et al. Cohort Profile: The INMA–Infancia y Medio Ambiente (Environment and Childhood) Project. *Int. J. Epidemiol.* **2012**, *41*, 930–940. [[CrossRef](#)]
29. Gonzalez-Palacios, S.; Navarrete-Muñoz, E.-M.; García-de-la-Hera, M.; Torres-Collado, L.; Santa-Marina, L.; Amiano, P.; Lopez-Espinosa, M.-J.; Tardon, A.; Riano-Galan, I.; Vrijheid, M.; et al. Sugar-Containing Beverages Consumption and Obesity in Children Aged 4–5 Years in Spain: The INMA Study. *Nutrients* **2019**, *11*, 1772. [[CrossRef](#)]
30. Vioque, J.; Navarrete-Muñoz, E.-M.; Gimenez-Monzó, D.; García-de-la-Hera, M.; Granado, F.; Young, I.S.; Ramón, R.; Ballester, F.; Murcia, M.; Rebagliato, M.; et al. Reproducibility and Validity of a Food Frequency Questionnaire among Pregnant Women in a Mediterranean Area. *Nutr. J.* **2013**, *12*, 26. [[CrossRef](#)]
31. U.S. Department of Agriculture (USDA). *Agriculture Research Service 2010 USDA National Nutrient Database for Standard Reference*; Release 23; Nutrient Data Laboratory: Washington, DC, USA, 2010.
32. Palma, I.; Farran, A.; Cantós, D. *Tablas de Composición de Alimentos Por Medidas Caseras de Consumo Habitual En España*; Centre d’Ensenyament Superior de Nutrició i Dietètica (CESNID); Primera.; Mc Graw-Hill Interamericana: Madrid, Spain, 2008.
33. Conners, C.K. *Conner’s Kiddie Continuous Performance Test (K-CPT V.5)*; Multi Health Syst: New York, NY, USA, 2006.
34. Conners, C.K.; Staff, M. *Conner’s Kiddie Continuous Performance Test (K-CPT): In Computer Program for Windows Technical Guide and Software Manual*; Multi Health Syst: Toronto, ON, Canada, 2001.
35. Conners, C.K. *Conners’ Continuous Performance Test II: In Computer Program for Windows Technical Guide and Software Manual*; MHS Staff, Ed.; North Tonawanda: New York, NY, USA, 2000.
36. Conners, C.K.; Epstein, J.N.; Angold, A.; Klaric, J. Continuous performance test performance in a normative epidemiological sample. *J. Abnorm. Child Psychol.* **2003**, *31*, 555–562. [[CrossRef](#)]
37. Yu, C.; Yao, W. Robust Linear Regression: A Review and Comparison. *Commun. Stat. Simul. Comput.* **2017**, *46*, 6261–6282. [[CrossRef](#)]
38. Nikoloulopoulos, A.; Karlis, D. On Modeling Count Data: A Comparison of Some Well-Known Discrete Distributions. *J. Stat. Comput. Simul.* **2008**, *78*, 437–457. [[CrossRef](#)]
39. Higgins, J.P.T.; Thompson, S.G.; Deeks, J.J.; Altman, D.G. Measuring Inconsistency in Meta-Analyses. *BMJ* **2003**, *327*, 557–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Gottlieb, D.J.; Vezina, R.M.; Chase, C.; Lesko, S.M.; Heeren, T.C.; Weese-Mayer, D.E.; Auerbach, S.H.; Corwin, M.J. Symptoms of Sleep-Disordered Breathing in 5-Year-Old Children Are Associated with Sleepiness and Problem Behaviors. *Pediatrics* **2003**, *112*, 870–877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Tong, J.; Liang, C.-M.; Huang, K.; Xiang, H.-Y.; Qi, J.; Feng, L.-L.; Lai, Y.-P.; Shao, S.-S.; Wu, X.-Y.; Tao, F.-B. Prenatal Serum Thallium Exposure and 36-Month-Old Children’s Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms: Ma’anshan Birth Cohort Study. *Chemosphere* **2020**, *244*, 125499. [[CrossRef](#)]
42. Ma, S.-S.; Zhu, D.-M.; Yin, W.-J.; Hao, J.-H.; Huang, K.; Tao, F.-B.; Tao, R.-X.; Zhu, P. The Role of Neonatal Vitamin D in the Association of Prenatal Depression with Toddlers ADHD Symptoms: A Birth Cohort Study. *J. Affect. Disord.* **2020**, *281*, 390–396. [[CrossRef](#)]
43. Asmussen, J.; Skovgaard, A.M.; Bilenberg, N. Trajectories of Dysregulation in Preschool Age. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* **2021**. [[CrossRef](#)]
44. Egeland, J.; Kovalik-Gran, I. Validity of the Factor Structure of Conners’ CPT. *J. Atten. Disord.* **2010**, *13*, 347–357. [[CrossRef](#)]
45. 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. [[CrossRef](#)]
46. del Río Garcia, C.; Torres-Sánchez, L.; Chen, J.; Schnaas, L.; Hernández, C.; Osorio, E.; Portillo, M.G.; López-Carrillo, L. Maternal MTHFR 677C>T Genotype and Dietary Intake of Folate and Vitamin B(12): Their Impact on Child Neurodevelopment. *Nutr. Neurosci.* **2009**, *12*, 13–20. [[CrossRef](#)]
47. Gao, Y.; Sheng, C.; Xie, R.-H.; Sun, W.; Asztalos, E.; Moddemann, D.; Zwaigenbaum, L.; Walker, M.; Wen, S.W. New Perspective on Impact of Folic Acid Supplementation during Pregnancy on Neurodevelopment/Autism in the Offspring Children A Systematic Review. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0165626. [[CrossRef](#)]
48. Barua, S.; Kuizon, S.; Chadman, K.K.; Flory, M.J.; Brown, W.T.; Junaid, M.A. Single-Base Resolution of Mouse Offspring Brain Methylome Reveals Epigenome Modifications Caused by Gestational Folic Acid. *Epigenetics Chromatin* **2014**, *7*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

49. Barua, S.; Chadman, K.K.; Kuizon, S.; Buenaventura, D.; Stapley, N.W.; Ruocco, F.; Begum, U.; Guariglia, S.R.; Brown, W.T.; Junaid, M.A. Increasing Maternal or Post-Weaning Folic Acid Alters Gene Expression and Moderately Changes Behavior in the Offspring. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Selhub, J.; Rosenberg, I.H. Excessive Folic Acid Intake and Relation to Adverse Health Outcome. *Biochimie* **2016**, *126*, 71–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Lertxundi, A.; Andiarrena, A.; Martínez, M.D.; Ayerdi, M.; Murcia, M.; Estarlich, M.; Guxens, M.; Sunyer, J.; Julvez, J.; Ibarluzea, J. Prenatal Exposure to PM2.5 and NO2 and Sex-Dependent Infant Cognitive and Motor Development. *Environ. Res.* **2019**, *174*, 114–121. [[CrossRef](#)]
52. Barnard, H.; Rao, R.; Xu, Y.; Froehlich, T.; Epstein, J.; Lanphear, B.P.; Yolton, K. Association of the Conners' Kiddie Continuous Performance Test (K-CPT) Performance and Parent-Report Measures of Behavior and Executive Functioning. *J. Atten. Disord.* **2018**, *22*, 1056–1065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Wu, K.; Taki, Y.; Sato, K.; Hashizume, H.; Sassa, Y.; Takeuchi, H.; Thyreau, B.; He, Y.; Evans, A.C.; Li, X.; et al. Topological Organization of Functional Brain Networks in Healthy Children: Differences in Relation to Age, Sex, and Intelligence. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wheelock, M.D.; Hect, J.L.; Hernandez-Andrade, E.; Hassan, S.S.; Romero, R.; Eggebrecht, A.T.; Thomason, M.E. Sex Differences in Functional Connectivity during Fetal Brain Development. *Dev. Cognit. Neurosci.* **2019**, *36*, 100632. [[CrossRef](#)]
55. Rubia, K.; Hyde, Z.; Halari, R.; Giampietro, V.; Smith, A. Effects of Age and Sex on Developmental Neural Networks of Visual-Spatial Attention Allocation. *Neuroimage* **2010**, *51*, 817–827. [[CrossRef](#)]



**Table 1.** K-CPT outcomes description.

	<i>Definition</i>	<i>Type of variable</i>	<i>Expressed in</i>
<b>Omission errors</b>	The failure to respond to targets (everything except the soccer ball picture)	Discrete	Number of times (n)
<b>Commission errors</b>	Responses given to non-targets (the soccer ball picture)	Discrete	Number of times (n)
<b>Hit reaction time [HRT]</b>	The average speed of correct responses for the entire test.	Continuous	Milliseconds (ms)
<b>Standard error of the hit reaction time [HRT(SE)]</b>	A measure of response speed consistency.	Continuous	Milliseconds (ms)
<b>Detectability or attentiveness [d']</b>	A measure of the ability to distinguish between targets (everything except the soccer ball picture) and non-targets (the soccer ball picture).	Continuous	No units
Own elaboration from MHS K-CPT test items and normative data.			



## ANEXO 3

---

Segundo artículo incluido en esta tesis doctoral.





Article

# Association between the Use of Folic Acid Supplements during Pregnancy and Children’s Cognitive Function at 7–9 Years of Age in the INMA Cohort Study

Laura María Compañ-Gabucio <sup>1,2,†</sup> , Laura Torres-Collado <sup>1,2,3,†</sup> , Manuela Garcia-de la Hera <sup>1,2,3,\*</sup> , Ana Fernández-Somoano <sup>3,4,5</sup> , Adonina Tardón <sup>3,4,5</sup> , Jordi Julvez <sup>3,6,7,8</sup> , Jordi Sunyer <sup>3,6,7,8,9</sup>, Marisa Rebagliato <sup>3,10,11</sup>, Mario Murcia <sup>3,10,12</sup>, Jesús Ibarluzea <sup>3,13,14,15</sup> , Loreto Santa-Marina <sup>3,13,14</sup> and Jesús Vioque <sup>1,2,3</sup>

- <sup>1</sup> Unidad de Epidemiología de la Nutrición (EPINUT), Departamento de Salud Pública, Historia de la Ciencia y Ginecología, Universidad Miguel Hernández (UMH), 03550 Alicante, Spain
- <sup>2</sup> Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), 03010 Alicante, Spain
- <sup>3</sup> CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, 28034 Madrid, Spain
- <sup>4</sup> Instituto Universitario de Oncología Del Principado de Asturias (IUOPA), Departamento de Medicina, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain
- <sup>5</sup> Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Roma Avenue s/n, 33001 Oviedo, Spain
- <sup>6</sup> Institut d’Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Hospital Universitari Sant Joan de Reus, 43204 Reus, Spain
- <sup>7</sup> ISGlobal, 08003 Barcelona, Spain
- <sup>8</sup> Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Spain
- <sup>9</sup> Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), 08003 Barcelona, Spain
- <sup>10</sup> Epidemiology and Environmental Health Joint Research Unit, Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), FISABIO—Public Health, FISABIO—Universitat Jaume I—Universitat de València, 46015 Valencia, Spain
- <sup>11</sup> Department of Medicine, Universitat Jaume I, 12071 Castellon de la Plana, Spain
- <sup>12</sup> Servicio de Análisis de Sistemas de Información Sanitaria, Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana, 46010 Valencia, Spain
- <sup>13</sup> Group of Environmental Epidemiology, Biodonostia Health Research Institute, 20014 Donostia-San Sebastian, Spain
- <sup>14</sup> Ministry of Health of the Basque Government, Sub-Directorate for Public Health and Addictions of Gipuzkoa, 20013 Donostia-San Sebastian, Spain
- <sup>15</sup> School of Psychology, University of the Basque Country UPV/EHU, 20018 Donostia-San Sebastian, Spain
- \* Correspondence: manoli@umh.es; Tel.: +34-96-591-9505
- † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Compañ-Gabucio, L.M.; Torres-Collado, L.; Garcia-de la Hera, M.; Fernández-Somoano, A.; Tardón, A.; Julvez, J.; Sunyer, J.; Rebagliato, M.; Murcia, M.; Ibarluzea, J.; et al. Association between the Use of Folic Acid Supplements during Pregnancy and Children’s Cognitive Function at 7–9 Years of Age in the INMA Cohort Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 12123. <https://doi.org/10.3390/ijerph191912123>

Academic Editors: Shaonong Dang and Jiaomei Yang

Received: 28 August 2022

Accepted: 22 September 2022

Published: 25 September 2022

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** This study investigated the association between maternal low (<400 µg/day) or high (≥1000 µg/day) folic acid supplements (FAs) use during pregnancy and the attentional function and working memory in boys and girls at age 7–9. A longitudinal analysis based on 1609 mother–child pairs from the Spanish Infancia y Medio Ambiente Project was carried out. Multivariable regression analyses revealed that, compared to the recommended FAs use, a low FAs use during the second period of pregnancy was associated with a lower alertness in all children ( $\beta = 18.70$  ms; 95% CI: 7.51; 29.89) and in girls ( $\beta = 30.01$  ms; 95% CI: 12.96; 47.01), and with a lower N-back Task performance in boys (d’ number 2-back ( $\beta = -0.25$ ; 95% CI:  $-0.49$ ; 0.01)). A high FAs use throughout the two periods of pregnancy was associated with a better N-back Task performance only in girls (d’ number 2-back ( $\beta = 0.28$ ; 95% CI: 0.01; 0.56) and d’ number 3-back ( $\beta = 0.32$ ; 95% CI: 0.08; 0.56)). The maternal use of FAs beyond the periconceptional period may affect children’s attentional function and working memory at age 7–9 differently for boys and girls.

**Keywords:** folic acid; deficiency; high; birth cohort study; working memory; attentional function; sex specific



## 1. Introduction

Folic acid use is widespread worldwide due to its preventive role against the occurrence [1] and recurrence [2] of neural tube defects. It is an essential micronutrient in various neurophysiological processes during embryonic neurodevelopment, such as DNA methylation, neurotransmitter synthesis, myelination, and nucleotide synthesis [3–6]. Specifically, it plays an important role in a complex metabolic pathway closely related to optimal embryonic brain development, one-carbon metabolism [6]. Alterations in this pathway, such as a folic acid deficiency, can affect the methylation processes of neural cells in the developing brain, leading to cognitive alterations and neurodevelopmental disorders [7], such as those of childhood behavior and autism [8–10]. Regarding these mechanisms, a recently published systematic review [8] has suggested that optimal maternal folic acid levels during pregnancy may increase fetal brain growth and fetal brain size, which may act as a preventive factor against atypical head growth trajectories, which are common in autism.

It is recommended that mothers planning to become pregnant should take 400 µg/day of folic acid supplements (FAs) during the periconceptual period and should not exceed the tolerable upper limit of 1000 µg/day of FAs [2,11]. Although the periconceptual use of FAs has a proven beneficial effect on the health of offspring, mothers in different countries have reported noncompliance with these recommendations. Studies carried out in Poland [12] and the UK [13] showed that 42.8 and 55% of mothers did not use periconceptual FAs. In contrast, a recently published study showed that only 14% of Italian mothers did not take periconceptual FAs, but 27.5% took 5000 µg/day or above, exceeding the tolerable upper limit [14]. Similarly, it has been shown in a previous study that 55.8% of Spanish mothers used less than 400 µg/day of FAs and 29.2% exceeded 1000 µg/day [15].

These high or low periconceptual FAs doses can cause changes in the fetal brain that can lead to cognitive alterations and neuropsychological disorders in children. Thus, it has been reported that children whose mothers used periconceptual FAs doses of <400 µg/day were more susceptible to autism [9], attentional dysfunction [15], or had poorer cognitive function [10]. On the other hand, it has also been reported that children whose mothers used ≥1000 µg/day of FAs presented a psychomotor delay at 1 year of age (y) [16] and verbal delay [17] and poorer attentional function at 4–5 y [15]. As most of these studies have focused their investigations on the periconceptual period, less is known about the effect of the maternal use of FAs after the first trimester on the offspring's cognitive function.

Mid-late pregnancy is characterized by the rapid growth and development of the fetal brain [18] and an intensive myelination [19]. These neurological processes are especially sensitive to folate concentrations [20] and are essential for children's cognitive development [21]. Although the scientific literature in this regard is scarce, results from the randomized trial, Folic Acid Supplementation in the Second and Third Trimesters (FASSTT) [22], have shown that children whose mothers continued using 400 µg/day of FAs after the first trimester had better cognitive function at age 3 [23], improved verbal reasoning at age 7 [23], and a higher information processing speed at age 11 [24]. Interestingly, the most recent publication by FASSTT showed an improvement in girls' verbal comprehension, suggesting a sex-specific effect on children's cognitive function of continued FAs use of 400 µg/day beyond the first trimester [24].

In our previous study [15], not only were different effects of FAs use found on cognitive function at 4–5 y according to the sex of the children but also according to the period of pregnancy studied. For periconceptual FAs use, a detrimental effect of both <400 and ≥1000 µg/day FAs doses on attentional function was observed in boys, whereas a protective effect of <400 µg/day FAs use during the second–third trimester of pregnancy was observed in girls. Thus, in the present study, we aimed to evaluate the association between low (<400 µg/day) or high (≥1000 µg/day) FAs use in each pregnancy period (the periconceptual period, second period, and entire pregnancy) and the cognitive function

in boys and girls at 7–9 y. We hypothesized that the use of both low and high doses of FAs during pregnancy can have negative effects on the attentional function and working memory of boys and girls at 7–9 y.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design and Population

The Infancia y Medio Ambiente (Environment and Childhood) Project (INMA; <http://www.proyectoinma.org>, accessed on 5 January 2022) is a Spanish multicenter mother–child prospective cohort study, whose main aim is to evaluate the effects of environmental exposures and diet during pregnancy on fetal and child development. The INMA Project is well-established in seven regions of Spain, following a common protocol [25]. In the present study, we analyzed the available information from four INMA sub-cohorts set up between 2003 and 2008 in Valencia, Sabadell (Catalonia), Asturias, and Gipuzkoa (Basque country).

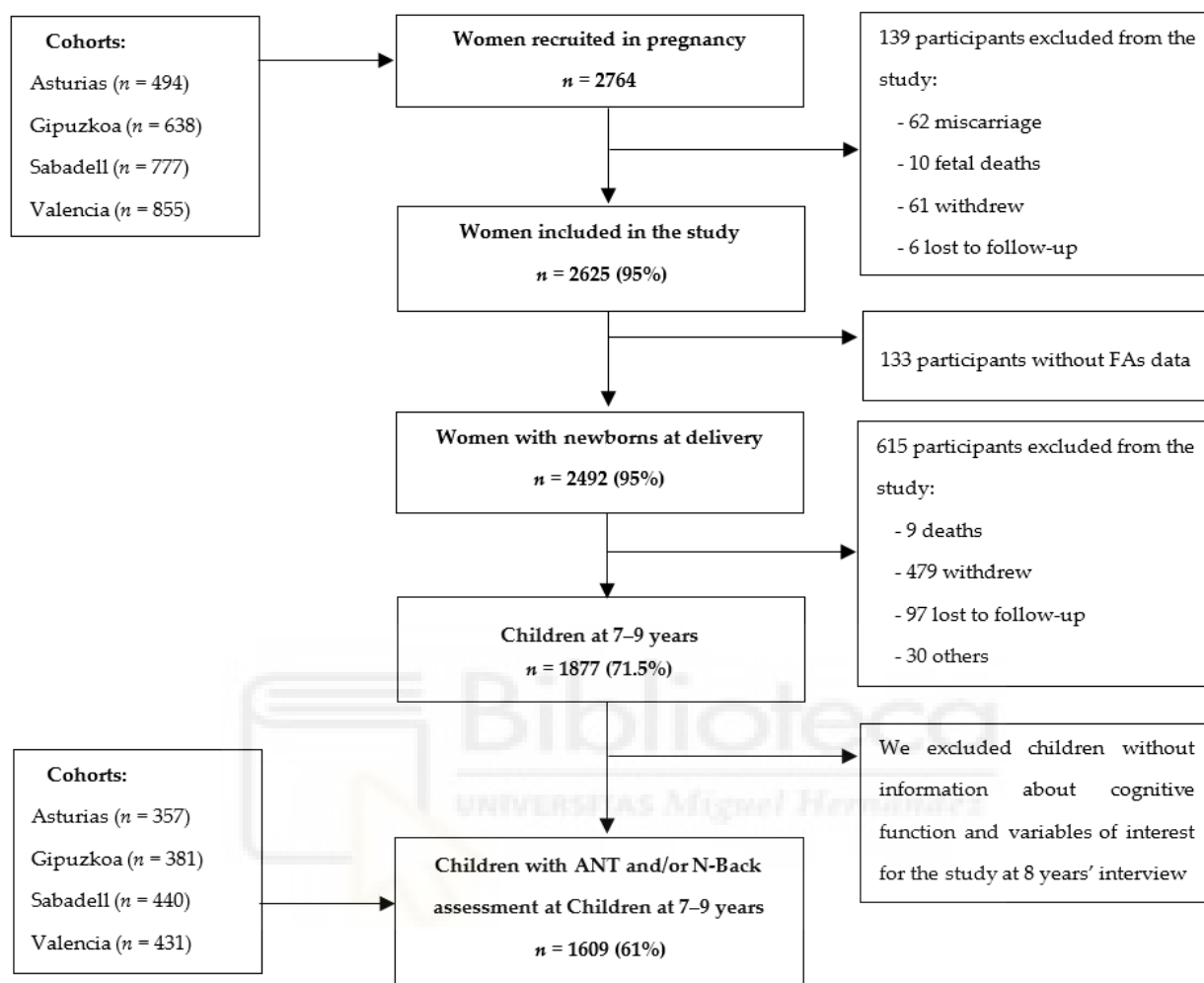
In the INMA cohorts, pregnant women received information about the project in their first prenatal visit at public health centers or public hospitals. Those interested in participating were recruited if they met the following criteria: (1) to be 16 years old or above, (2) to have no communication difficulties in Spanish or in another official Autonomous Community language (Basque or Catalan), (3) to have a singleton pregnancy, (4) to plan to give birth at the cohort’s referral hospital, and (5) that the pregnancy was not the result of assisted reproduction. Once pregnant women had signed the informed consent, data collection was carried out in different follow-up visits: in the first trimester of pregnancy, in the third trimester, and at delivery. After delivery, mothers and children were followed up when children were 14 months, 26 months, 4–5 y, and 7–9 y. The initial study population consisted of 2764 pregnant women, 2625 of whom gave birth to a live newborn between May 2004 and August 2008. Withdrawal from the project, being untraceable during follow-up visits, miscarriage, abortion, or fetal deaths led to the exclusion of the remaining 139 mothers. As the present study aimed to investigate FAs use during pregnancy, we excluded 133 additional mothers without FAs information. Finally, our study population consisted of 1609 mother–child pairs with complete information on the main variables when children were aged 7–9 y. In Figure 1, we present the flowchart of the study participants.

The INMA Project was approved by the Institutional Ethical Committees of the participating hospitals of each cohort (CEIC-Hospital La Fe, Valencia; CEIC-Hospital de Zumárraga, Gipuzkoa; CEIC-Parc de Salut Mar, Barcelona; CEIC-Hospital Universitario Central de Asturias). Further details on the study sub-cohorts’ characteristics, study population recruitment, and study design can be found elsewhere [25,26].

### 2.2. FAs Assessment

The assessment of FAs use during pregnancy has been described previously [16,27]. Trained personnel administered two validated food frequency questionnaires during pregnancy (FFQs) [28] to estimate pregnant women’s FAs use and dietary folate intake. The first FFQ was collected at weeks 10–13 of pregnancy to estimate FAs use and dietary folate intake from three months preconception to the third month of pregnancy, and the second FFQ was collected at weeks 28–32 to estimate FAs use and dietary folate intake from the fourth to the seventh month of pregnancy. The folate content of food was mainly obtained from USDA food composition tables [29] and other Spanish-published sources [30]. The consumption of FAs or vitamin and mineral preparations containing FAs were obtained through specific questions about supplements in the FFQ. FAs use was estimated based on daily dose, supplement brand name and composition, and duration of consumption for each period of pregnancy. As in previous studies [15,17], we estimated the average daily use of FAs and dietary folate intake for each woman in the periconceptual period (average from 3 months before pregnancy to month 3 of pregnancy), the second period of pregnancy (average from month 4 to 7), and during the whole pregnancy (average of the periconceptual and the second period). We categorized the use of FAs in the above-mentioned pregnancy periods as <400 µg/day, 400–999 µg/day (the reference category in

our statistical analyses), and  $\geq 1000 \mu\text{g}/\text{day}$ . Dietary folate intake per  $100 \mu\text{g}/\text{d}$  increase was used as a covariate in adjusted models.



**Figure 1.** Flowchart of the study population in the main phases of the INMA project.

### 2.3. Working Memory Assessment in Children

Children's working memory was assessed using the N-back task [31,32]. This is a continuous computerized performance task to evaluate working memory in children in approximately 25 min. For the present study, it was administered to children during the 7–9-year interview by trained personnel. During the task, children have to press a button on the keyboard if the stimulus (in this study, numbers) presented on the screen is the same as the stimulus presented earlier. The children's responses depended on the load or level they were doing (1-back, 2-back, or 3-back). For instance, with a 1-back load, the child has to remember the previous number; in a 2-back load, the child has to remember the penultimate number; and in a 3-back load, the child has to remember the antepenultimate number presented. The 1-back load is the simplest one and, in this study, we chose to discard its results due to a ceiling effect, i.e., a perfect score was achieved by most of the children. The 2-back load can be an indicator of general mental abilities, while the highest load, the 3-back, can be an indicator of superior mental functions [33]. N-back task is used to determine detectability ( $d'$ ) for each load, which was calculated as follows:  $d' = z(\text{hit rate}) - z(\text{false alarm rate})$ . A  $d'$  score reflects the ability to distinguish signal from noise, so a higher  $d'$  indicates a better working memory performance [34].

#### 2.4. Attentional Function Assessment in Children

Children's attentional function was assessed with the Attentional Network Test (ANT), whose validity has been supported using neuroimaging in different studies with large child cohorts [32,35,36]. This computer test characterizes attentional function in children older than 6 y [35]. During the test, a row of five yellow fish appears either above or below a fixation point. Children are asked to "feed" the fish in the middle as quickly as possible by pressing either the right or left button on the mouse, depending on the direction in which the fish in the middle is pointing. They have to ignore the flanking fish, which point either in the same (congruent) or opposite (incongruent) direction as the fish in the middle. When children performed the test correctly, they received positive auditory reinforcement (Woo hoo!) [37]. The ANT was administered by trained personnel in the 7–9-year interview. All the children received the same instructions, and in each cohort, the same computer was used for all the children.

This test is a widely used neuropsychological tool which provides different outcomes to characterize different aspects of attentional function. First, we analyzed the three attention networks: alerting, which reflects the ability to produce and maintain optimal vigilance and performance during tasks; orienting, which involves shifting attention to sensory stimuli; and conflict, which involves detecting and resolving conflict among responses, error detection, and response inhibition. We then analyzed the number of omission errors (a measure of selective attention), the number of commission errors (a measure of impulsivity), the standard error of the hit reaction time (HRT-SE) (a measure of speed response variability), and accuracy (a measure of performance precision). Higher scores in all the above-mentioned outcomes indicate a poorer attentional function, except in the case of accuracy, for which higher scores indicate optimal performance [32,37–39].

#### 2.5. Other Variables

Information on other sociodemographic and lifestyle characteristics was collected using structured questionnaires administered by trained field workers. The following sociodemographic and lifestyle variables regarding the mothers were used in adjusted models as potential confounders: age (in years), energy intake (in kilocalories/day), social class (I + II (high), III (medium), IV + V (low)), educational level (primary or less, secondary, university), parity (0 or  $\geq 1$ ), overall tobacco exposure (yes/no), which includes mothers' smoking habit and passive exposure to tobacco during pregnancy, and pre-pregnancy BMI (continuous). In addition, we adjusted for father's BMI (continuous) and for other children's variables, such as sex (male, female) and age at cognitive examination (in years). Furthermore, we used the following variables in sensitivity analyses: mother's iodine supplementation during pregnancy (<100, 100–149,  $\geq 150$   $\mu\text{g}/\text{day}$ ), mother's fish intake during pregnancy (in grams/day), mother's verbal reasoning (continuous), time of initiating FAs usage (month 0, month 1–2, month 3, no use), mother's acetaminophen use during pregnancy (no/yes), mother's  $\text{NO}_2$  exposure during pregnancy ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), duration of breastfeeding (no, <20 weeks, >20 weeks), and children's dietary folate intake (in  $\mu\text{g}/\text{day}$  adjusted by energy intake in kilocalories).

#### 2.6. Statistical Analysis

We conducted descriptive, multivariable, and sensitivity analyses using the R 3.4.2 software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). We performed a descriptive analysis to characterize sociodemographic, lifestyle, and obstetric factors of pregnant women from the four INMA sub-cohorts. The Kolmogorov test was used to check the normal distribution of the quantitative variables, which were all found to be non-normal. As a result, we used the non-parametric Kruskal–Wallis test for quantitative variables and the Chi-square test for qualitative variables in the bivariate descriptive analyses.

In multivariable analyses, we adjusted for those covariates with  $p$  value < 0.20 in bivariate analysis and those that changed the magnitude of the main effects by >10%. We excluded from the analyses those children whose score of correct responses was lower than

70%, which is considered to be a low accuracy score in the ANT test [39]. We also excluded those children whose reaction times were shorter than 200 ms because of physiological implausibility, which suggested perseverative or anticipatory responses [40]. Multiple robust linear regression models using an MM-type estimator were conducted to evaluate the association between FAs use and ANT outcomes (alerting, orienting, conflict, HRT-SE) for each pregnancy period: periconceptional period, second period of pregnancy, and throughout the entire pregnancy [41]. Negative binomial regression models were used to assess associations between FAs use and ANT count outcomes (number of omission and commission errors) for each period of pregnancy [42]. The regression coefficients of negative binomial models were exponentiated to obtain IRR (incidence rate ratios) which should be interpreted as relative risk. Multivariable censored regression (tobit) was used to estimate the association between FAs use and N-back task outcomes (detectability  $n-2$  and  $n-3$ ) as well as ANT outcome (accuracy). In addition, we used a meta-analysis to obtain the combined estimates for the four INMA sub-cohorts. The  $I^2$  statistic was used to quantify heterogeneity, the random effects model was applied when heterogeneity was detected ( $I^2 > 50\%$ ), and when it was not detected, the fixed effects models was applied ( $I^2 \leq 50\%$ ) [43]. Because previous studies have shown that neurodevelopment during the embryonic and fetal periods may be different for girls and boys [44,45], we additionally ran models stratifying by the children's sex.

Finally, sensitivity analyses were performed to assess the robustness of the main results. We adjusted the basal model by mother or child variables that could be related to child cognitive function development. In the basal model, we included maternal variables, such as iodine intake from supplements; fish consumption during pregnancy; verbal reasoning outcome of the similarities subtest from the Wechsler Adult Intelligence Scale-III; FAs use initiation;  $\text{NO}_2$  exposition during pregnancy; duration of breastfeeding; and use of acetaminophen during pregnancy. Regarding child variables, we adjusted the basal model with child dietary folate intake at age 8, assessed by validated FFQ [46]. In addition, to evaluate any potential influence on the association found, we excluded some mothers and/or children from the analysis with conditions such as preterm deliveries ( $n = 1527$ ), mothers with medical conditions that may have influenced the use of FAs (diabetes mellitus, epilepsy, or thyroid disease) ( $n = 1318$ ), mothers who did not use FAs during pregnancy ( $n = 1499$ ), obese children according to the WHO criteria (97th percentile) ( $n = 1329$ ), children with psychomotor delay (<85th percentile) at age 1 determined by the Bayley Scales of Infant and Toddler development (BSID) ( $n = 1434$ ), children with low scores (<76.3 score) in executive function at age 5 determined by the McCarthy Scales of Children's Abilities (MSCA) ( $n = 1283$ ), and children with inattention at age 5, assessed by the Conner's Kiddie Continuous Performance test ( $n = 1087$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Study Population Characteristics

We show the general characteristics of the pregnant women and their children according to the four areas of the study in Table 1.

The median age of the mothers at delivery was 31 years old. A high proportion of the mothers attained secondary studies (41.7%), had a low social class (46.8%), and reported exposure to tobacco during pregnancy (58.1%).

During the periconceptional period of pregnancy, 14.5% of the mothers used the recommended FAs doses of 400–999  $\mu\text{g}/\text{day}$ , while 54.3% used doses of <400  $\mu\text{g}/\text{day}$  FAs and 31.2% used  $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{day}$  (Table 1). In this period of pregnancy, Sabadell was the area of study with the highest number of mothers taking doses of <400  $\mu\text{g}/\text{day}$  FAs (65.2%), whereas Gipuzkoa was the area with the highest number of mothers using  $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{day}$  FAs doses (39.6%) ( $p$ -value < 0.001).

**Table 1.** Socio-demographic, lifestyle, and obstetric characteristics of parents and children at 7-year follow-up of INMA cohort study, Spain, 2003–2008.

	All Cohorts, <i>n</i> = 1609	Valencia, <i>n</i> = 431	Sabadell, <i>n</i> = 440	Asturias, <i>n</i> = 357	Gipuzkoa, <i>n</i> = 381	<i>p</i> -Value <sup>1</sup>
Mother's age, y	31 (28; 34)	30 (28; 33)	30 (28; 33)	32 (29; 35)	31 (29; 33)	<0.001
Mother's education						<0.001
Primary or less	300 (18.7)	111 (25.8)	102 (23.2)	48 (13.4)	39 (10.2)	
Secondary	671 (41.7)	186 (43.2)	191 (43.4)	160 (44.8)	134 (35.2)	
University	638 (39.7)	134 (31.1)	147 (33.4)	149 (41.7)	208 (54.6)	
Mother's social class						<0.001
I + II (high)	406 (25.2)	89 (20.6)	100 (22.7)	88 (24.6)	129 (33.9)	
III	450 (28.0)	117 (27.1)	144 (32.7)	76 (21.3)	113 (29.7)	
IV + V (low)	753 (46.8)	225 (52.2)	196 (44.5)	193 (54.1)	139 (36.5)	
Parity ≥ 1	680 (42.3)	189 (43.9)	188 (42.7)	137 (38.4)	166 (43.6)	0.398
Overall tobacco exposure during pregnancy, yes	934 (58.1)	315 (73.1)	260 (59.1)	156 (43.7)	203 (53.3)	<0.001
Missing values	41 (2.6)	5 (1.2)	8 (1.8)	18 (5.0)	10 (2.6)	
Prepregnancy mother's BMI, kg/m <sup>2</sup>						0.008
<25	1183 (73.5)	311 (72.2)	317 (72.0)	248 (69.5)	307 (80.6)	
≥25–30	311 (19.3)	85 (19.7)	84 (19.1)	84 (23.5)	58 (15.2)	
≥30	115 (7.2)	35 (8.1)	39 (8.9)	25 (7.0)	16 (4.2)	
Prepregnancy father's BMI, kg/m <sup>2</sup>						<0.001
<25	687 (42.7)	187 (43.4)	204 (46.4)	114 (31.9)	182 (47.8)	
≥25–30	704 (43.6)	199 (46.2)	170 (38.6)	175 (49.0)	160 (42.0)	
≥30	189 (11.8)	45 (10.4)	60 (13.6)	55 (15.4)	29 (7.6)	
Missing values	29 (1.8)	0 (0.0)	6 (1.4)	13 (3.6)	10 (2.6)	
Dietary folate, µg/d						
In 1st period of pregnancy	297 (239; 364)	292 (231; 359)	283 (230; 347)	313 (247; 382)	306 (255; 367)	<0.001
In 2nd period of pregnancy	297 (241; 358)	274 (219; 349)	291 (237; 345)	302 (245; 367)	312 (266; 370)	<0.001
FAs µg/d, in 1st period of pregnancy						<0.001
400–999	233 (14.5)	68 (15.8)	45 (10.2)	64 (17.9)	56 (14.7)	
<400	874 (54.3)	249 (57.8)	287 (65.2)	164 (45.9)	174 (45.7)	
≥1000	502 (31.2)	114 (26.5)	108 (24.5)	129 (36.1)	151 (39.6)	
FAs µg/d, in 2nd period of pregnancy						<0.001
400–999	426 (26.5)	200 (46.4)	52 (11.8)	133 (37.3)	41 (10.8)	
<400	907 (56.4)	144 (33.4)	366 (83.2)	100 (28.0)	297 (78.0)	
≥1000	276 (17.2)	87 (20.2)	22 (5.0)	124 (34.7)	43 (11.3)	
Child's sex						0.631
Boys	816 (50.7)	210 (48.7)	229 (52.0)	188 (52.7)	189 (49.6)	
Girls	793 (49.3)	221 (51.3)	211 (48.0)	169 (47.3)	192 (50.4)	
Child's age <sup>2</sup> , in years	7.7 (7.3; 8.0)	7.6 (7.4; 7.6)	6.8 (6.6; 7.1)	8.3 (8.1; 8.4)	7.9 (7.8; 8.0)	<0.001
ANT outcomes						
HRT-SE, ms	305.6 (245; 364)	323.2 (266; 382)	320.3 (260; 369)	260.8 (196; 329)	304.3 (259; 356)	<0.001
Accuracy	1.0 (1.0; 1.0)	1.0 (0.9; 1.0)	1.0 (0.9; 1.0)	1.0 (1.0; 1.0)	1.0 (1.0; 1.0)	<0.001
Comission errors, num	3 (1; 5)	4 (2; 7)	4 (2; 7)	1 (0; 3)	2 (1; 4)	<0.001
Omission errors, num	2 (0; 5)	3 (1; 7)	2 (1; 5)	0 (0; 2)	2 (0; 4)	<0.001
Alerting	45 (−3.5; 100.5)	52 (0.8; 101.8)	39 (−10.6; 100.9)	45 (4.0; 90.5)	48.5 (−6.0; 108.0)	0.314
Orienting	38.5 (−14.0; 85.0)	40.0 (−15.5; 88.5)	30.5 (−17.5; 81.3)	41.5 (0.0; 83.0)	38.0 (−17.0; 85.5)	0.358
Conflict, ms	71 (32.5; 115)	68.5 (28.5; 111)	75.5 (35.9; 122)	63.0 (33.5; 101)	78.0 (36.0; 128)	0.004
N-back outcomes						
d' numbers 1-back	3.9 (3.4; 3.9)	3.9 (2.8; 3.9)	3.9 (2.6; 3.9)	3.9 (3.9; 3.9)	3.9 (3.9; 3.9)	<0.001
d' numbers 2-back	1.9 (1.1; 2.6)	1.7 (1.0; 2.5)	1.7 (1.0; 2.3)	2.3 (1.5; 3.9)	2.0 (1.3; 2.7)	<0.001
d' numbers 3-back	1.1 (0.6; 1.7)	1.0 (0.3; 1.7)	1.0 (0.3; 1.4)	1.4 (1.0; 2.2)	1.4 (1.0; 1.9)	<0.001

FAs, folic acid supplement; HRT-SE, hit reaction time standard error (ms); INMA, Infancia y Medio Ambiente; ms, milliseconds; num, number. Values are medians (IQRs) for mother's age, age at cognitive examination, dietary folate, ANT outcomes and N-back outcomes, and values are *n* (%) for the rest of variables. <sup>1</sup> *p*-values of differences between study cohorts from Chi-square test (categorical variables) and Kruskal–Wallis test (continuous non-parametric variables), <sup>2</sup> age at neurocognitive examination.

During the second period of pregnancy, the proportion of mothers using <400 µg/day FAs doses increased slightly (56.4%), while the number of mothers using ≥1000 µg/day FAs doses decreased by almost half (17.2%) (Table 1). In this period of pregnancy, Sabadell continued to be the area with the highest proportion of mothers using <400 µg/day FAs doses (83.2%), and Asturias was the area with the highest number of mothers using FAs doses of ≥1000 µg/day (34.7%) ( $p$ -value < 0.001).

The percentage of boys and girls participating in this study was almost the same, 50.7 and 49.3%, respectively (Table 1). The median age of the children at the time of the neurocognitive assessment was 7.7 years old, but it was higher in the children from Asturias (8.3 years) and lower in the children from Sabadell (6.8 years) ( $p$ -value < 0.001). Regarding the ANT outcomes (related to attentional function), the children from Gipuzkoa scored higher in the conflict attention network (78.0 ms; 36.0–128.0) ( $p$ -value = 0.004) which means a lower capacity to detect and resolve changes in attention to sensory stimuli. However, according to other ANT outcomes, the children from Valencia appeared to have the worst attentional performance compared to the other areas of study. These children scored higher in the HRT-SE (323.2 ms; 266.0–382.3) which reflects a higher response variability throughout the test ( $p$ -value < 0.001), that is, a poorer sustained attention. Furthermore, they scored higher in the omission (3; 1–7) and commission (4; 2–7) errors ( $p$ -value < 0.001), suggesting inattentiveness and impulsivity, respectively. Regarding the N-back task outcomes (related to working memory), almost all the children achieved the highest score in the  $d'$  numbers 1-back (3.9; 3.4–3.9). Finally, the children from Asturias obtained the highest results (i.e., better performance) in the  $d'$  numbers 2-back (2.3; 1.5–3.9) and in the  $d'$  numbers 3-back (1.4; 1.0–2.2) together with children from Gipuzkoa (1.4; 1.0–1.9) ( $p$ -value < 0.001).

### 3.2. FAs Use during Pregnancy and Cognitive Outcomes in Children

The fully adjusted models with the combined associations between the maternal FAs use in each period of pregnancy and the scores in the neurocognitive tests in the children at age 7–9 are shown in Table 2.

**Table 2.** Fully adjusted combined association between folic acid supplements (FAs) intake during pregnancy and attentional function in children aged 7–9 y of INMA cohort study, Spain, 2003–2008.

Attentional Network Test ( $n = 1609$ )	FAS (µg/d)	Periconceptional Period <sup>a</sup>			Second Period <sup>a</sup>			Entire Pregnancy <sup>a</sup>		
		$n$	$\beta$ <sup>b</sup>	(95% CI)	$n$	$\beta$ <sup>b</sup>	(95% CI)	$n$	$\beta$ <sup>b</sup>	(95% CI)
HRT-SE (ms) <sup>c</sup>	400–999	233	Ref.		426	Ref.		299	Ref.	
	<400	874	−4.07	(−15.86; 7.73)	907	−5.02	(−16.21; 6.17)	885	−4.64	(−15.85; 6.56)
	≥1000	502	−6.52	(−19.09; 6.04)	276	−7.98 <sup>#</sup>	(−29.37; 13.41)	425	−10.96	(−23.23; 1.31)
Accuracy	400–999	233	Ref.		426	Ref.		299	Ref.	
	<400	874	0.00	(−0.00; 0.00)	907	−0.00	(−0.00; 0.00)	885	−0.00	(−0.01; 0.00)
	≥1000	502	0.00	(−0.00; 0.00)	276	0.00	(−0.00; 0.01)	425	0.00	(−0.00; 0.01)
Commission errors (num) <sup>c</sup>	400–999	233	Ref.		426	Ref.		299	Ref.	
	<400	874	0.94	(0.82; 1.08)	907	1.02	(0.89; 1.14)	885	1.05	(0.92; 1.19)
	≥1000	502	0.90	(0.77; 1.04)	276	1.00	(0.87; 1.16)	425	0.99	(0.86; 1.14)
Omission errors (num) <sup>c</sup>	400–999	233	Ref.		426	Ref.		299	Ref.	
	<400	874	1.08	(0.90; 1.30)	907	0.96 <sup>#</sup>	(0.74; 1.25)	885	0.96	(0.81; 1.14)
	≥1000	502	0.94	(0.77; 1.15)	276	0.87	(0.71; 1.06)	425	0.85	(0.70; 1.04)
Alerting <sup>c</sup>	400–999	233	Ref.		426	Ref.		299	Ref.	
	<400	874	−7.83	(−21.56; 5.90)	907	18.70 <sup>*</sup>	(7.51; 29.89)	885	6.27	(−5.56; 18.11)
	≥1000	502	−8.33	(−22.52; 5.86)	276	5.03	(−6.72; 16.77)	425	−1.05	(−13.29; 11.20)
Orienting <sup>c</sup>	400–999	233	Ref.		426	Ref.		299	Ref.	
	<400	874	−5.95 <sup>#</sup>	(−29.52; 17.62)	907	1.03	(−9.38; 11.44)	885	2.23	(−9.03; 13.48)
	≥1000	502	−8.25 <sup>#</sup>	(−27.26; 10.77)	276	−0.91	(−13.66; 11.84)	425	−0.86	(−13.29; 11.54)

Table 2. Cont.

Attentional Network Test (n = 1609)	FAS (µg/d)	Periconceptual Period <sup>a</sup>			Second Period <sup>a</sup>			Entire Pregnancy <sup>a</sup>		
		n	β <sup>b</sup>	(95% CI)	n	β <sup>b</sup>	(95% CI)	n	β <sup>b</sup>	(95% CI)
Conflict (ms) <sup>c</sup>	400–999	233	Ref.		426	Ref.		299	Ref.	
	<400	874	3.78	(−5.65; 13.21)	907	−0.62	(−8.99; 7.76)	885	−1.71	(−10.63; 7.21)
	≥1000	502	6.51	(−3.47; 16.49)	276	1.69	(−7.80; 11.18)	425	−2.81	(−12.57; 6.95)
<b>N-back task (n = 1312)</b>										
d' number 2-back	400–999	193	Ref.		346	Ref.		238	Ref.	
	<400	703	−0.04	(−0.23; 0.14)	721	−0.14	(−0.31; 0.03)	709	0.10	(−0.08; 0.28)
	≥1000	416	−0.05	(−0.24; 0.15)	245	−0.03	(−0.22; 0.16)	365	0.15	(−0.04; 0.34)
d' number 3-back	400–999	276	Ref.		346	Ref.		238	Ref.	
	<400	829	0.05	(−0.11; 0.21)	721	0.06	(−0.09; 0.20)	709	0.03	(−0.12; 0.19)
	≥1000	398	0.03	(−0.13; 0.20)	245	0.00	(−0.16; 0.16)	365	0.05	(−0.12; 0.21)

<sup>a</sup> Models were adjusted by energy intake (in kilocalories), dietary folate intake per 100 µg/d increase, cohort, social class (I + II (high), III or IV + V (low)), educational level (primary or less, secondary, or university), parity (0 or ≥1), tobacco exposition during the periconceptual period (no or yes), mother’s age (in years), mother’s BMI (continuous), father’s BMI (continuous), child’s sex, and child’s age at 7 y follow-up examination (in years).

<sup>b</sup> Robust linear regression model was used for hit reaction time and hit reaction time SE (HRT-SE). Negative binomial regression model was used for commission and omission errors (estimates are incidence rate ratios, IRR). Tobit regression model was used for N-back task outcomes and accuracy. <sup>c</sup> Higher scores means lower performance. \* p-value < 0.05. # I<sup>2</sup> > 50%, random models were used.

Compared to 400–999 µg/day, we observed a statistically significant association between the use of FAs < 400 µg/day in the second period of pregnancy and a higher alerting score in the children at age 7–9 (β = 18.70, 95% CI 7.51; 29.89). In other words, the offspring of mothers who used lower doses of FAs (<400 µg/day) than recommended during the second period of pregnancy were less able to achieve and maintain an optimal alertness. This negative association was similar in each cohort of the study, although in Valencia, it was stronger and reached a statistical significance (Figure 2).

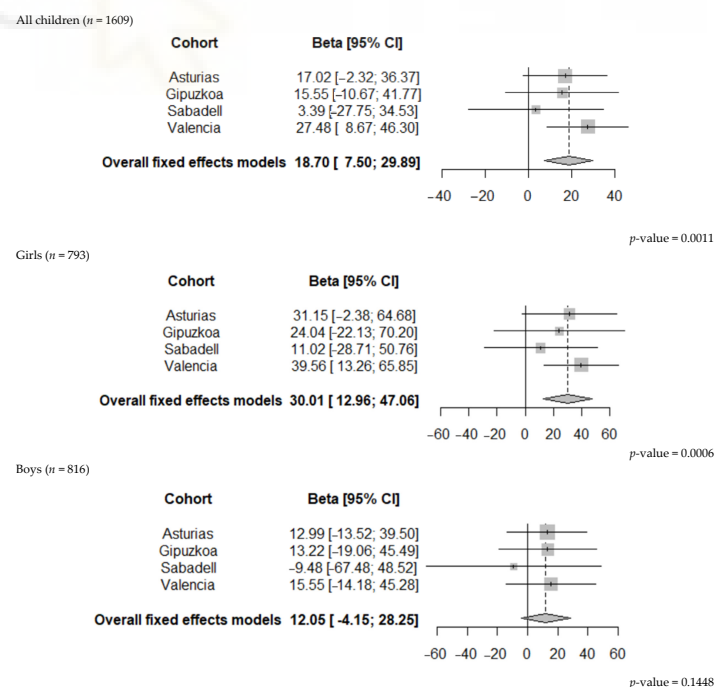


Figure 2. Pooled estimates of the associations between FAs (<400 µg/day compared to 400–999 µg/day) in the second period and alerting in all children, boys, and girls at 7–9 years of age.



### 3.3. FAs Use during Pregnancy and Cognitive Outcomes in Children by Sex

The associations between the maternal FAs use in each period of pregnancy and the cognitive outcomes at 7–9 y are shown in Table 3 for the girls and in Table 4 for the boys.

**Table 3.** Fully adjusted combined association between folic acid supplements (FAs) intake during pregnancy and attentional function in girls aged 7–9 y of INMA cohort study, Spain, 2003–2008.

Attentional Network Test (n = 793)	FAS (µg/d)	Periconceptual Period <sup>a</sup>			Second Period <sup>a</sup>			Entire Pregnancy <sup>a</sup>		
		n	β <sup>b</sup>	(95% CI)	n	β <sup>b</sup>	(95% CI)	n	β <sup>b</sup>	(95% CI)
HRT-SE (ms) <sup>c</sup>	400–999	129	Ref.		216	Ref.		445	Ref.	
	<400	425	−3.33	(−18.37; 11.62)	437	−14.25	(−29.15; 0.64)	215	−15.85	(−32.61; 0.91)
	≥1000	239	−3.22 <sup>#</sup>	(−30.25; 23.81)	140	−7.49 <sup>#</sup>	(−42.23; 27.25)	133	−20.38 <sup>*</sup>	(−39.12; −1.63)
Accuracy	400–999	129	Ref.		216	Ref.		445	Ref.	
	<400	425	−0.00	(−0.01; 0.01)	437	0.00	(−0.00; 0.01)	215	−0.00	(−0.01; 0.00)
	≥1000	239	0.00	(−0.00; 0.01)	140	0.00	(−0.00; 0.01)	133	−0.00	(−0.01; 0.01)
Commission errors (num) <sup>c</sup>	400–999	129	Ref.		216	Ref.		445	Ref.	
	<400	425	1.00 <sup>#</sup>	(0.64; 1.35)	437	0.88	(0.75; 1.04)	215	0.98	(0.82; 1.18)
	≥1000	239	0.93	(0.76; 1.14)	140	0.88	(0.72; 1.08)	133	0.97	(0.79; 1.19)
Omission errors (num) <sup>c</sup>	400–999	129	Ref.		216	Ref.		445	Ref.	
	<400	425	1.21	(0.95; 1.54)	437	1.03 <sup>#</sup>	(0.58; 1.84)	215	0.85	(0.66; 1.09)
	≥1000	239	0.93	(0.72; 1.22)	140	0.97 <sup>#</sup>	(0.46; 2.03)	133	0.75	(0.49; 1.16)
Alerting <sup>c</sup>	400–999	129	Ref.		216	Ref.		445	Ref.	
	<400	425	−17.93	(−39.81; 3.95)	437	30.01	(12.96; 47.01) <sup>*</sup>	215	8.96	(−11.55; 29.48)
	≥1000	239	−16.14	(−38.53; 6.25)	140	6.23	(−10.86; 23.32)	133	−0.41	(−21.04; 20.23)
Orienting <sup>c</sup>	400–999	129	Ref.		216	Ref.		445	Ref.	
	<400	425	−18.07 <sup>#</sup>	(−42.59; 6.44)	437	4.37	(−11.06; 19.80)	215	3.80	(−14.72; 22.31)
	≥1000	239	−12.47	(−29.91; 4.97)	140	13.27	(−4.56; 31.10)	133	7.65	(−11.74; 27.04)
Conflict (ms) <sup>c</sup>	400–999	129	Ref.		216	Ref.		445	Ref.	
	<400	425	7.88	(−5.98; 21.73)	437	1.74	(−11.32; 14.81)	215	5.06	(−9.98; 20.11)
	≥1000	239	11.60	(−3.51; 26.71)	140	1.77	(−12.15; 15.69)	133	3.70	(−12.04; 19.44)
<b>N-back task (n = 639)</b>										
d' number 2-back	400–999	107	Ref.		168	Ref.		106	Ref.	
	<400	336	−0.01	(−0.25; 0.23)	343	−0.06	(−0.29; 0.18)	351	0.21	(−0.05; 0.46)
	≥1000	196	0.00	(−0.26; 0.26)	128	0.09	(−0.18; 0.36)	182	0.28 <sup>*</sup>	(0.01; 0.56)
d' number 3-back	400–999	107	Ref.		168	Ref.		106	Ref.	
	<400	336	−0.06	(−0.27; 0.16)	343	0.14	(−0.07; 0.34)	351	0.12	(−0.11; 0.34)
	≥1000	196	0.09	(−0.14; 0.32)	128	0.14	(−0.10; 0.37)	182	0.32 <sup>*</sup>	(0.08; 0.56)

<sup>a</sup> Models were adjusted by energy intake (in kilocalories), dietary folate intake per 100 µg/d increase, cohort, social class (I + II (high), III or IV + V (low)), educational level (primary or less, secondary, or university), parity (0 or ≥1), tobacco exposition during the periconceptual period (no or yes), mother’s age (in years), mother’s BMI (continuous), father’s BMI (continuous), and child’s age at 7 y follow-up examination (in years). <sup>b</sup> Robust linear regression model was used for hit reaction time and hit reaction time SE (HRT-SE). Negative binomial regression model was used for commission and omission errors (estimates are incidence rate ratios, IRR). Tobit regression model was used for N-back task outcomes and accuracy. <sup>c</sup> Higher scores means lower performance. <sup>\*</sup> p-value < 0.05. <sup>#</sup> I<sup>2</sup> > 50%, random models were used.

When the analyses were stratified by sex, no statistically significant associations were found between the maternal use of FAs during the periconceptual period and the cognitive outcomes (ANT—attention—and N-back task—working memory) for the girls (Table 3) or for the boys (Table 4).

During the second period of pregnancy, we found a detrimental effect of the maternal FAs use of <400 µg/day, compared to the recommended use of FAs (400–999 µg/day), on the girls’ alerting (ANT outcome) (β = 30.01, 95% CI 12.96; 47.01) (Table 3), but this effect was not statistically significant in the boys (β = 12.05, 95% CI −4.15; 28.25) (Table 4). In the boys, we observed a statistically significant association between the maternal use of FAs below the recommended dose (<400 µg/day) and working memory (N-back task). Specifically, the boys whose mothers used <400 µg/day FAs doses compared to those who used 400–999 µg/day performed worse in the d’ numbers 2-back (β = −0.25, 95% CI −0.49; 0.01) (Table 4). We found no other statistically significant associations in either the girls or boys.

**Table 4.** Fully adjusted combined association between folic acid supplements (FAs) intake during pregnancy and attentional function in boys aged 7–9 y of INMA cohort study, Spain, 2003–2008.

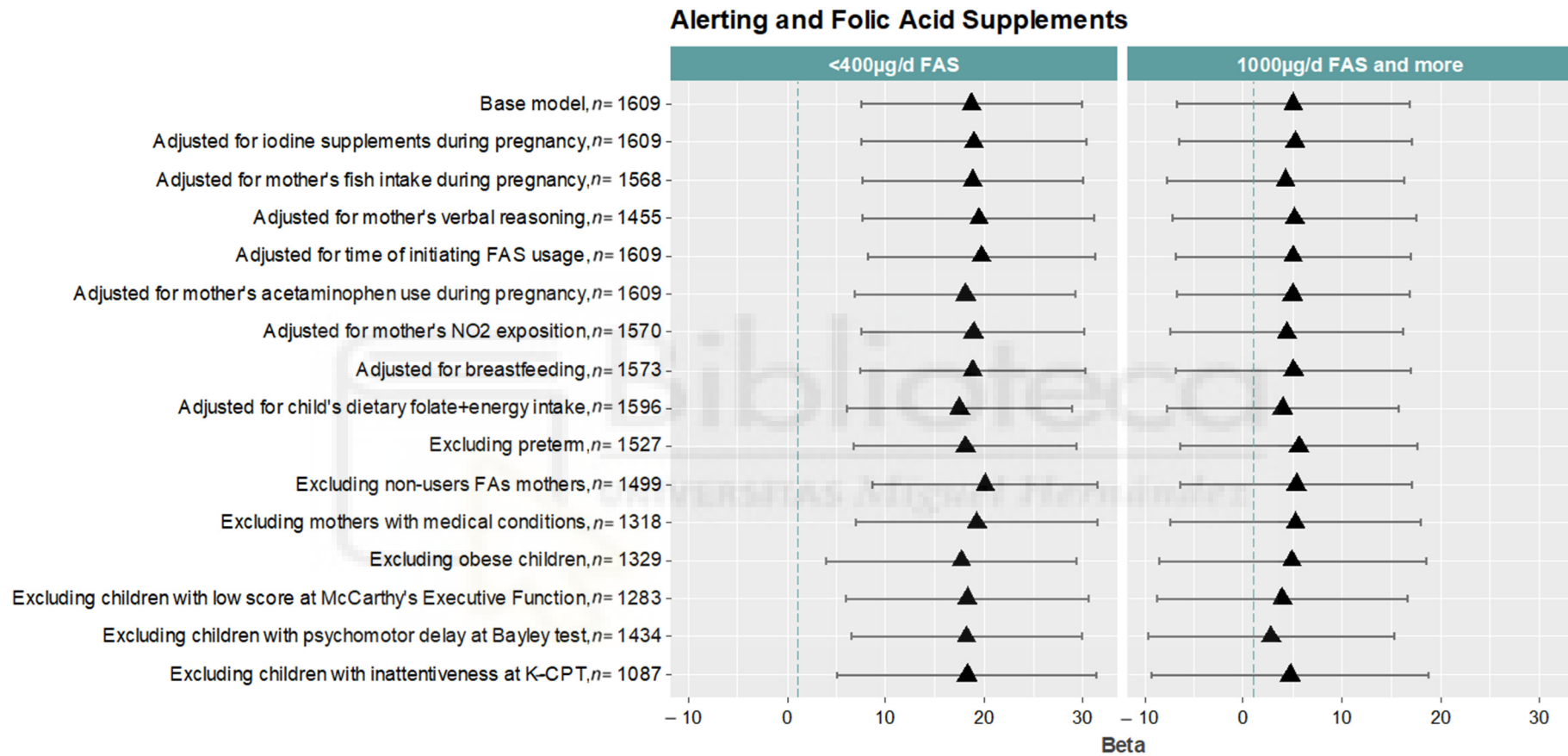
Attentional Network Test (n = 816)	FAS (µg/d)	n	Periconceptual Period <sup>a</sup>		Second Period <sup>a</sup>		Entire Pregnancy <sup>a</sup>			
			β <sup>b</sup>	(95% CI)	n	β <sup>b</sup>	(95% CI)	n	β <sup>b</sup>	(95% CI)
HRT-SE (ms) <sup>c</sup>	400–999	104	Ref.		210	Ref.		166	Ref.	
	<400	449	−8.92	(−27.00; 9.16)	470	7.19	(−10.05; 24.43)	440	5.15	(−10.20; 20.50)
	≥1000	263	−8.59	(−27.10; 9.92)	136	−3.20	(−23.69; 17.28)	210	−2.35	(−19.44; 14.73)
Accuracy	400–999	104	Ref.		210	Ref.		166	Ref.	
	<400	449	0.01	(−0.00; 0.01)	470	−0.00	(−0.01; 0.00)	440	0.00	(−0.00; 0.01)
	≥1000	263	0.01	(−0.00; 0.01)	136	−0.00	(−0.01; 0.01)	210	0.00	(−0.00; 0.01)
Commission errors (num) <sup>c</sup>	400–999	104	Ref.		210	Ref.		166	Ref.	
	<400	449	0.88	(0.72; 1.07)	470	1.15	(0.97; 1.37)	440	1.04	(0.87; 1.23)
	≥1000	263	0.84	(0.68; 1.03)	136	1.06	(0.86; 1.29)	210	0.94	(0.78; 1.14)
Omission errors (num) <sup>c</sup>	400–999	104	Ref.		210	Ref.		166	Ref.	
	<400	449	1.05	(0.79; 1.39)	470	1.02	(0.80; 1.30)	440	1.10	(0.87; 1.40)
	≥1000	263	1.05	(0.79; 1.41)	136	0.99	(0.74; 1.31)	210	1.00 <sup>#</sup>	(0.61; 1.61)
Alerting <sup>c</sup>	400–999	104	Ref.		210	Ref.		166	Ref.	
	<400	449	2.08	(−16.12; 20.28)	470	12.05	(−4.15; 28.25)	440	2.75	(−12.31; 17.81)
	≥1000	263	1.16	(−18.37; 20.70)	136	7.84	(−9.81; 25.49)	210	0.52	(−15.97; 17.02)
Orienting <sup>c</sup>	400–999	104	Ref.		210	Ref.		166	Ref.	
	<400	449	9.27	(−7.58; 26.12)	470	−0.20	(−15.00; 14.61)	440	1.12 <sup>#</sup>	(−23.82; 26.05)
	≥1000	263	−1.66	(−19.91; 16.59)	136	−14.31	(−32.49; 3.88)	210	−6.17	(−22.30; 9.95)
Conflict (ms) <sup>c</sup>	400–999	104	Ref.		210	Ref.		166	Ref.	
	<400	449	2.44	(−11.16; 16.05)	470	−2.25	(−14.45; 9.96)	440	−5.38	(−17.30; 6.53)
	≥1000	263	2.22	(−11.48; 15.91)	136	0.48	(−13.18; 14.14)	210	−5.78	(−18.74; 7.18)
<b>N-back task (n = 673)</b>										
d' number 2-back	400–999	86	Ref.		178	Ref.		132	Ref.	
	<400	367	−0.10	(−0.38; 0.17)	378	−0.25 <sup>*</sup>	(−0.49; 0.01)	358	0.07	(−0.17; 0.31)
	≥1000	220	−0.07	(−0.36; 0.21)	117	−0.13	(−0.40; 0.13)	183	0.12	(0.14; 0.37)
d' number 3-back	400–999	86	Ref.		178	Ref.		132	Ref.	
	<400	367	0.15	(−0.09; 0.39)	378	0.00	(−0.24; 0.24)	358	−0.01	(−0.21; 0.20)
	≥1000	220	−0.03	(−0.27; 0.22)	117	−0.15	(−0.42; 0.11)	183	−0.19	(−0.41; 0.03)

<sup>a</sup> Models were adjusted by energy intake (in kilocalories), dietary folate intake per 100 µg/d increase, cohort, social class (I + II (high), III or IV + V (low)), educational level (primary or less, secondary, or university), parity (0 or ≥1), tobacco exposition during the periconceptual period (no or yes), mother's age (in years), mother's BMI (continuous), father's BMI (continuous), and child's age at 7 y follow-up examination (in years). <sup>b</sup> Robust linear regression model was used for hit reaction time and hit reaction time SE (HRT-SE). Negative binomial regression model was used for commission and omission errors (estimates are incidence rate ratios, IRR). Tobit regression model was used for N-back task outcomes and accuracy. <sup>c</sup> Higher scores means lower performance. <sup>\*</sup> *p*-value < 0.05. <sup>#</sup> I<sup>2</sup> > 50%, random models were used.

Throughout pregnancy, compared to the recommended use of FAs (400–999 µg/day), we observed a statistically significant association between ≥ 1000 µg/day maternal FAs use and girls' attentional function (ANT). Specifically, the girls whose mothers used higher than recommended doses of FAs (≥1000 µg/day) had a lower HRT-SE score (β = −20.38, 95% CI −39.12; −1.63), which indicates better sustained attention (Table 3). These FAs doses were also associated with an improved working memory performance (N-back task) in the girls, particularly regarding both the d' numbers 2-back and d' numbers 3-back (β = 0.28, 95% CI 0.01; 0.56 and β = 0.32, 95% CI 0.08; 0.56, respectively) (Table 3). No statistically significant associations were found between the maternal use of FAs and the attentional function or working memory for the boys in this period of pregnancy (Table 4).

### 3.4. Sensitivity Analyses

We carried out several sensitivity analyses under different scenarios to assess the robustness of the association found between FAs use in the second period of pregnancy (<400 vs. 400–999 µg/day) and the children's alerting (Figure 3).



**Figure 3.** Sensitivity analyses of the associations between FAs use (<400 and  $\geq 1000$  compared to 400–999  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) during the second period of pregnancy and alerting in all children ( $n = 1609$ ) at age 7–9.

Overall, the associations remained similar to the basal model ( $\beta = 18.70$ , 95% CI 7.51; 29.89). We observed a slightly stronger association when we adjusted for some mothers' conditions, such as the initiation of FAs use ( $\beta = 19.71$ , 95% CI 8.20; 31.22), the non-use of FAs in any period of pregnancy ( $\beta = 20.11$ , 95% CI 8.68; 31.54), and verbal reasoning ( $\beta = 19.45$ , 95% CI 7.70; 31.19) and also when we excluded mothers with medical conditions ( $\beta = 19.24$ , 95% CI 7.03; 31.46). In contrast, the association became slightly weaker when we adjusted for the dietary folate intake of the children at age 8 ( $\beta = 17.48$ , 95% CI 6.12; 28.84) and when we excluded those children with obesity ( $\beta = 16.67$ , 95% CI 4.04; 29.31) (Figure 3).

#### 4. Discussion

In this study, we found that the children of mothers using less than 400  $\mu\text{g}/\text{day}$  of FAs during the second period of pregnancy presented more impairment in attentional function (i.e., alertness) at the age of 7–9 y than the children of mothers using 400–999  $\mu\text{g}/\text{day}$ . We also found that the girls whose mothers used <400  $\mu\text{g}/\text{day}$  FAs had a poorer attentional function (i.e., alertness) at the age of 7–9 y, while the boys showed a poorer working memory. Moreover, the girls whose mothers used  $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{day}$  FAs during the entire pregnancy showed a better sustained attention and working memory at 7–9 y. Finally, contrary to our expectations, we did not find associations between periconceptual FAs use and children's neurocognitive functions.

It is well known that the use of recommended doses of FAs (400  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) during the periconceptual period can prevent abnormalities in fetal central nervous system development, such as neural tube defects [47]. A growing number of studies have shown that the use of recommended periconceptual FAs doses is related to improvements in the neurocognitive functioning in childhood [48]. Conversely, a deficient periconceptual FAs use has been associated with a harmful effect on mental development at age 1 [49], while a high FAs use may be related to a psychomotor delay at age 1 [16] and verbal deficits at age 5 [17]. In a previous study, when mothers who used recommended periconceptual FAs doses were compared to those who used non-recommended doses, a negative association between FAs use of <400 and  $\geq 1000$   $\mu\text{g}/\text{day}$  and children's attentional function at age 5 was observed [15]. The use of a similar population of study led us to hypothesize a potential association between non-recommended periconceptual FAs use and the attentional function and/or working memory of children at age 7–9, but contrary to our expectations, we did not find any association. We do not have a clear explanation for this lack of association, although it could be due in part to the difference in age of the children in the two studies and thus to a different level of brain maturation and cognitive function development [35,50,51].

We found a reduced alertness in children of 7–9 y whose mothers used low doses of FAs during the second period of pregnancy. The use of FAs during this period of pregnancy has not been sufficiently studied because recommendations for its use are focused on the periconceptual period. Nevertheless, the results on the use of FAs in this second period reported by the Folic Acid Supplementation in the Second and Third Trimesters (FASSTT trial) randomized trial support our findings [22]. To our knowledge, this is the only randomized trial which analyzed the effects of continuing to take 400  $\mu\text{g}/\text{day}$  of FAs after the first trimester of pregnancy. In this trial, before the second period of pregnancy began, 119 mothers who took 400  $\mu\text{g}/\text{day}$  during the first trimester of pregnancy were randomized into two groups, placebo or continuing to take 400  $\mu\text{g}/\text{day}$ . They found that children whose mothers continued to take 400  $\mu\text{g}/\text{day}$  scored higher in word reasoning at age 7 [23] and cognition at ages 3 [23] and 11 [24]. Similarly, an observational study has associated a deficient maternal folate status after the first trimester with detrimental effects on children's neurocognitive functions, such as reduced brain volume at 6–8 y and lower language and visuospatial abilities [10]. This could be because the second period of pregnancy is characterized by the rapid growth and myelination of the fetal brain, which

are processes closely related to optimal cognitive functioning and are particularly sensitive to maternal folate deficiency [19–21].

We also found that the association between maternal FAs use beyond the first trimester and children's cognitive functions at 7–9 y was different in girls and boys. We observed that a low use of FAs during the second period of pregnancy was associated with a poorer alertness in girls and a poorer working memory in boys. In contrast, a previous study [15] showed that girls at 4–5 y whose mothers took low FAs doses after the first trimester presented higher attentiveness, although an association in boys was found. The discrepancies between the results of the two studies can be explained by the children's age difference and, thus, the different development levels of their cognitive functions. The attentional function and working memory undergo important development during early childhood [52], especially at age 7–9 [53,54]. This age is characterized by a pronounced development of the brain frontal lobe [35], a key structure which contributes to the improvement of both these high cognitive functions [36]. In particular, during this stage, girls perform more accurately in tasks related to the working memory [55] and attentional function than boys [37], suggesting that girls have a more developed cognitive function than boys at the same age. This fact may partly explain the different effect of maternal FAs on the cognitive function of girls and boys.

To our knowledge, no other previous studies have specifically analyzed the effect of the maternal use of FAs after the first trimester of pregnancy on children's attention and/or working memory. However, in line with our present results, some studies have shown different sex-specific effects of maternal FAs use on other cognitive functions, such as verbal function. For instance, Caffrey et al. [24] found a beneficial effect of 400 µg/day FAs use beyond the first trimester on verbal comprehension in girls at age 11, but not in boys. Similarly, an observational study carried out in the Indian population found that the association between an adequate maternal folate status at week 30 of pregnancy with verbal fluency was stronger in girls than boys at 9–10 y [56]. One explanation for these findings could be the sex-specific DNA methylation response to FAs use after the first trimester. In this regard, a previous study has shown that the DNA methylation in genes related to brain development appears to be different in boys and girls [57]. Another possible explanation could be the sex differences in brain activity patterns related to cognition and functional brain development in infancy, childhood [19], and even in adolescence [39]. Girls present a higher rate of myelination than boys in some brain structures between 3 and 60 months, such as the corpus callosum and left frontal and left temporal white matter [58]. At 7–9 y, a rapid growth takes place in the connections of the frontal lobe, a brain structure which is closely related to working memory and attentional function [53,54]. During this period, a more pronounced cognitive growth was documented in girls [55]. Specifically, girls appeared to experience earlier working memory maturation peaks [59,60] and more advanced attentional function [37], suggesting a biological basis for the differences found between boys and girls.

We also found that the use of high doses of FAs ( $\geq 1000$  µg/day) throughout pregnancy improved girls' sustained attention and working memory at 7–9 y. High FAs use may result in the presence of unmetabolized folic acid in the bloodstream that can saturate our body mechanism to convert folic acid to folate [61], leading to a reduced involvement of folate in fetal neurodevelopmental processes. For this reason, we expected to find a negative effect, if any, of high FAs use during pregnancy on children's cognitive function. This can be justified in two ways. First, girls have been described as presenting better sustained attention than their male peers [62]. Second, the effect of high FAs use during pregnancy on the health of offspring is still inconclusive [61]. The maternal use of high periconceptional doses of FAs has been associated with a higher risk of newborns being small for gestational age for both weight and height at birth [63,64]. In contrast, the maternal use of high FAs doses during pregnancy did not appear to increase the risk of neural tube defects [65] or preterm births [66]. In addition, high FAs doses have been associated with a reduced risk of congenital heart problems [67], low weight at birth [66],

and congenital male genital abnormalities at birth [68]. With regard to cognitive function, high FAs use has been associated with poorer attention at 4–5 y in both boys and girls [15] but also with an improved vocabulary at 18 months [69]. We have no explanation for this unexpected finding, although this is not the first time that a protective effect on children's cognitive function of an apparently harmful exposure during pregnancy has been described in the scientific literature. A multicentric birth cohort study in six European countries has associated higher prenatal mercury levels and maternal alcohol consumption, two harmful exposures, during pregnancy with better cognitive performance in children at 6–11 y [70]. Similarly, another study has shown that higher organochlorine prenatal exposure can increase attentional function (i.e., the hit reaction time) in girls at age 8 [71]. Nevertheless, we should also be aware that all the above unexpected results may be due to reverse causation or residual confounding. For instance, one possible outcome related to high FAs use, and thus to residual confounding, is maternal illness. Pregnant women who take high doses of FAs during pregnancy usually do so because they have an illness which can reduce the absorption of folic acid. This is the case for epilepsy, whose treatment acts as a folic acid antagonist, thus making a high dose of FAs necessary to prevent neural tube defects in offspring [72]. However, in our study population, when we performed the sensitivity analyses excluding mothers with health conditions that could influence the associations found, the results did not change.

Our findings can also be explained by the involvement of folic acid in epigenetic mechanisms during pregnancy. Inadequate maternal nutrition can disrupt the fetal epigenetic mechanisms [73], which can lead to adverse postnatal health outcomes, such as neurodevelopmental disorders [74]. Folic acid is involved in a complex pathway called one-carbon metabolism, which is responsible for providing a number of substrates for fetal epigenetic processes [75]. In addition, one-carbon metabolism appears to control the fetal brain cell population and brain epigenetic expression through DNA methylation [6]. Thus, alterations in the one-carbon metabolism, especially folate deficiency, could be associated with neurodevelopmental disorders and behavioral and cognitive problems in childhood [7,9]. However, the role of one-carbon metabolism in brain development and the long-term cognitive effects are still mostly unknown.

In brief, our findings provide new evidence on the effects of the use of non-recommended FAs doses during different periods of pregnancy on cognitive function in children at age 7–9. Although our results are not confirmatory enough and they need to be confirmed, they may help to establish new recommendations for the use of FAs in the Spanish population, with a special focus on mid–late pregnancy, as the recommended FAs use during this period can be beneficial to cognitive development in children. In addition, our results suggest that girls are more susceptible than boys to non-recommended doses of FAs during pregnancy, although this is a subject of study that requires further investigation.

This study presents some limitations. First, it has an observational design, and the risk of uncontrolled or residual confounding exists. Although we have adjusted the models for a wide variety of potential risk factors and have also conducted sensitivity analyses, it is possible that we have overlooked some potentially confounding variables. In this sense, we have not taken into account the variation between neurocognitive assessors as a possible confounder variable, although all the assessors were trained to conduct the evaluations, so differences between them should be minimal. Second, there is a possible bias due to subjects lost to follow-up. However, the mothers of those children who performed the cognitive assessment at age 7–9 presented very similar age, educational, and socioeconomic statuses as well as FAs use compared to mothers who were excluded from the analyses because of lost to follow-up or because their children did not carry out the cognitive assessment. Third, our results should be interpreted with caution because no formal interaction by sex was observed. Fourth, maternal FAs use was calculated according to self-reported responses, which tend to be overreported in the case of healthy behaviors and underreported in the case of negative ones. Self-reported estimations can cause a misclassification, but if it does, it would likely be non-differential. In this sense, to classify mothers according to their

FAs use, we used an FFQ which may be limited when estimating exact absolute values, although it was previously validated in this population of pregnant women [28]. Fifth, our results may not be generalizable to all countries due to differences in food folic acid fortification policies; it should be noted that in Spain and most of Europe, foods are not fortified. Finally, our results do not explain the neurophysiological mechanisms which lead the use of non-recommended doses of FAs during pregnancy to affect cognitive function at 7–9 y.

Several strengths should be also considered. The prospective design of the INMA project may help to minimize recall and selection bias, and although the sample size was not very large, we were able to detect significant associations from the joint efforts of four well-established INMA cohorts with common protocols. In addition, we used a validated FFQ test to estimate the maternal FAs intake during pregnancy. We also used standardized and computerized batteries to assess children's cognitive function, which can detect small changes in children's responses and provide objective assessments. The cognitive assessment was performed by trained personnel blinded to exposure status, representing a more unbiased assessment of the possible associations between maternal FAs use and cognitive function. We showed the detailed information on the doses of FAs use during two distinct periods of pregnancy, which few published studies have provided. Thus, the present study together with our previous study are the only ones that have examined the effect of maternal FAs use in different periods of pregnancy on children's attentional function and working memory in the Spanish population. Finally, we carried out several sensitivity analyses which reinforced the consistency of our results, and they also provide evidence of sex differences in the effects of maternal FAs use during pregnancy, opening new lines of research.

## 5. Conclusions

This study suggests that FAs use beyond the first trimester of pregnancy at the current periconceptional recommended dose to prevent neural tube defects can improve children's alertness at age 7–9. In addition, a low FAs use can have a different effect on girls and boys. In the case of girls, it can reduce alertness, while in boys, it can reduce working memory, two essential cognitive functions for academic and daily life performance. Thus, although the existing recommendations for FAs use focus on the periconceptional period of pregnancy, our findings may add evidence to support the need to continue taking the recommended FAs dose of 400 µg/day after the first trimester of pregnancy to ensure the proper cognitive development of both girls and boys at age 7–9. Further studies in this line of research are needed to determine these recommendations.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.G.-d.I.H. and J.V.; data curation, L.M.C.-G., L.T.-C. and M.G.-d.I.H.; formal analysis, L.M.C.-G. and L.T.-C.; supervision, M.G.-d.I.H. and J.V.; writing—original draft, L.M.C.-G. and L.T.-C.; writing—review and editing, M.G.-d.I.H., A.F.-S., A.T., J.J., J.S., M.R., M.M., J.I., L.S.-M. and J.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Grants from the UE (FP7-ENV-2011 cod 282957 and HEALTH.2010.2.4.5-1); Spanish Institute of Health Carlos III-Ministry of Economy and Competitiveness (Red INMA G03/176, CB06/02/0041; FIS-FEDER: PI03/1615, PI04/1509, PI04/1112, PI04/1931, PI04/2018, PI05/1079, PI05/1052, PI06/1213, PI06/0867, PI07/0314, PI09/02311, PI09/02647, PI11/01007, PI11/02591, PI11/02038, PI12/00610, PI13/02429, PI13/1944, PI13/2032, PI14/00891, PI14/01687, PI16/1288, PI17/00663, PI04/1436, PI08/1151, PI04/2018, PI09/02311, PI13/02429, FISS-19-PI18-00909, PI18/01142, and PI09/00090, incl. FEDER funds; Miguel Servet-FEDER CP11/00178, CP15/00025, and CP116/00051); Generalitat Valenciana (FISABIO UGP 15-230, UGP-15-244, and UGP-15-249, Grupos de Investigación Consolidados AICO/2021/347); Generalitat de Catalunya-CIRIT (1999SGR 00241); ISGlobal is a member of the CERCA Programme; Fundació La marató de TV3 (090430); CIBERESP; Obra Social Cajastur/Fundación Liberbank; Universidad de Oviedo; Alicia Koplowitz Foundation 2017; Department of Health of the Basque Government (2005111093); Department of Health of the Basque Government (2013111089); Provincial Government of Gipuzkoa (DFG06/002); and annual agreements with the municipalities of the study area (Zumárraga, Urretxu, Legazpi,

Azkoitia y Azpeitia y Beasain). This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III through the projects “PI16/00261 and PI21/00266” (co-funded by European Regional Development Fund “A way to make Europe”) and PI18/00909 (co-funded by FEDER, “A way to make Europe”/“Investing in your future”). Jordi Julvez holds the Miguel Servet-II contract (CPII19/00015) awarded by the Instituto de Salud Carlos III (co-funded by the European Social Fund “Investing in your future”). This study was funded by Universidad Miguel Hernández through “AYUDAS A LA INVESTIGACIÓN VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN 2022”.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the participating hospitals of each cohort (CEIC-Hospital La Fe, Valencia; CEIC-Hospital de Zumárraga, Gipuzkoa; CEIC-Parc de Salut Mar, Barcelona; and CEIC-Hospital Universitario Central de Asturias).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to confidentiality and ethical reasons.

**Acknowledgments:** We would like to acknowledge the English revision made by Jessica Gorlin. We thank all the mothers and children participating in the INMA study for their generous collaboration and the field research workers for their work administering the questionnaires and collecting data. The analyses presented here were not preregistered. The data, code, and material necessary to reproduce the analyses presented here are available from the first author upon reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Czeizel, A.E.; Dudás, I. Prevention of the First Occurrence of Neural-Tube Defects by Periconceptional Vitamin Supplementation. *N. Engl. J. Med.* **1992**, *327*, 1832–1835. [\[CrossRef\]](#)
2. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of Neural Tube Defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* **1991**, *338*, 131–137. [\[CrossRef\]](#)
3. Bailey, L.B.; Stover, P.J.; McNulty, H.; Fenech, M.F.; Gregory, J.F.; Mills, J.L.; Pfeiffer, C.M.; Fazili, Z.; Zhang, M.; Ueland, P.M.; et al. Biomarkers of Nutrition for Development-Folate Review. *J. Nutr.* **2015**, *145*, 1636S–1680S. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Lassi, Z.S.; Salam, R.A.; Haider, B.A.; Bhutta, Z.A. Folic Acid Supplementation during Pregnancy for Maternal Health and Pregnancy Outcomes. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2013**, *3*, CD006896. [\[CrossRef\]](#)
5. Desai, A.; Sequeira, J.M.; Quadros, E.V. The Metabolic Basis for Developmental Disorders Due to Defective Folate Transport. *Biochimie* **2016**, *126*, 31–42. [\[CrossRef\]](#)
6. Clare, C.E.; Brassington, A.H.; Kwong, W.Y.; Sinclair, K.D. One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2019**, *7*, 263–287. [\[CrossRef\]](#)
7. Mastrototaro, G.; Zaghi, M.; Sessa, A. Epigenetic Mistakes in Neurodevelopmental Disorders. *J. Mol. Neurosci. MN* **2017**, *61*, 590–602. [\[CrossRef\]](#)
8. Rubini, E.; Baijens, I.M.M.; Horánszky, A.; Schoenmakers, S.; Sinclair, K.D.; Zana, M.; Dinnyés, A.; Steegers-Theunissen, R.P.M.; Rousian, M. Maternal One-Carbon Metabolism during the Periconceptional Period and Human Foetal Brain Growth: A Systematic Review. *Genes* **2021**, *12*, 1634. [\[CrossRef\]](#)
9. Freedman, R.; Hunter, S.K.; Law, A.J.; Clark, A.M.; Roberts, A.; Hoffman, M.C. Choline, Folic Acid, Vitamin D, and Fetal Brain Development in the Psychosis Spectrum. *Schizophr. Res.* **2021**, *247*, 16–25. [\[CrossRef\]](#)
10. Ars, C.L.; Nijs, I.M.; Marroun, H.E.; Muetzel, R.; Schmidt, M.; Steenweg-de Graaff, J.; van der Lugt, A.; Jaddoe, V.W.; Hofman, A.; Steegers, E.A.; et al. Prenatal Folate, Homocysteine and Vitamin B12 Levels and Child Brain Volumes, Cognitive Development and Psychological Functioning: The Generation R Study. *Br. J. Nutr.* **2019**, *122*, S1–S9. [\[CrossRef\]](#)
11. Institute of Medicine (U.S.) (Ed.) *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*; National Academy Press: Washington, DC, USA, 1998; ISBN 978-0-309-06554-2.
12. Wojtowicz, A.; Babczyk, D.; Galas, A.; Skalska-Swistek, M.; Gorecka, M.; Witkowski, R.; Huras, H. Evaluation of the Prevalence of Folic Acid Supplementation before Conception and through the First 12 Weeks of Pregnancy in Polish Women at High Risk of Fetal Anomalies. *Ginekol. Pol.* **2022**, *93*, 489–495. [\[CrossRef\]](#)
13. Shields, R.; Khan, O.; Lim Choi Keung, S.; Hawkes, A.J.; Barry, A.; Devall, A.J.; Quinn, S.D.; Keay, S.D.; Arvanitis, T.N.; Bick, D.; et al. Quantitative Assessment of Pregnancy Outcome Following Recurrent Miscarriage Clinic Care: A Prospective Cohort Study. *BMJ Open* **2022**, *12*, e052661. [\[CrossRef\]](#)



14. Missanelli, A.; Lombardi, N.; Bettiol, A.; Lanzi, C.; Rossi, F.; Pacileo, I.; Donvito, L.; Garofalo, V.; Raval di, C.; Vannacci, A.; et al. Birth Outcomes in Women Exposed to Diagnostic Radiology Procedures during First Trimester of Pregnancy: A Prospective Cohort Study. *Clin. Toxicol.* **2022**, *60*, 175–183. [[CrossRef](#)]
15. Compañ Gabucio, L.M.; García de la Hera, M.; Torres Collado, L.; Fernández-Somoano, A.; Tardón, A.; Guxens, M.; Vrijheid, M.; Rebagliato, M.; Murcia, M.; Ibarluzea, J.; et al. The Use of Lower or Higher Than Recommended Doses of Folic Acid Supplements during Pregnancy Is Associated with Child Attentional Dysfunction at 4–5 Years of Age in the INMA Project. *Nutrients* **2021**, *13*, 327. [[CrossRef](#)]
16. Valera-Gran, D.; García de la Hera, M.; Navarrete-Muñoz, E.M.; Fernandez-Somoano, A.; Tardón, A.; Julvez, J.; Forns, J.; Lertxundi, N.; Ibarluzea, J.M.; Murcia, M.; et al. Folic Acid Supplements during Pregnancy and Child Psychomotor Development after the First Year of Life. *JAMA Pediatr.* **2014**, *168*, e14261. [[CrossRef](#)]
17. Valera-Gran, D.; Navarrete-Muñoz, E.M.; García de la Hera, M.; Fernández-Somoano, A.; Tardón, A.; Ibarluzea, J.; Balluerka, N.; Murcia, M.; González-Safont, L.; Romaguera, D.; et al. Effect of Maternal High Dosages of Folic Acid Supplements on Neurocognitive Development in Children at 4–5 y of Age: The Prospective Birth Cohort Infancia y Medio Ambiente (INMA) Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2017**, *106*, 878–887. [[CrossRef](#)]
18. Tamura, T.; Goldenberg, R.L.; Chapman, V.R.; Johnston, K.E.; Ramey, S.L.; Nelson, K.G. Folate Status of Mothers During Pregnancy and Mental and Psychomotor Development of Their Children at Five Years of Age. *Pediatrics* **2005**, *116*, 703–708. [[CrossRef](#)]
19. Gilmore, J.H.; Knickmeyer, R.C.; Gao, W. Imaging Structural and Functional Brain Development in Early Childhood. *Nat. Rev. Neurosci.* **2018**, *19*, 123–137. [[CrossRef](#)]
20. Roffman, J.L. Neuroprotective Effects of Prenatal Folic Acid Supplementation: Why Timing Matters. *JAMA Psychiatry* **2018**, *75*, 747. [[CrossRef](#)]
21. Naninck, E.F.G.; Stijger, P.C.; Brouwer-Brolsma, E.M. The Importance of Maternal Folate Status for Brain Development and Function of Offspring. *Adv. Nutr.* **2019**, *10*, 502–519. [[CrossRef](#)]
22. McNulty, B.; McNulty, H.; Marshall, B.; Ward, M.; Molloy, A.M.; Scott, J.M.; Dornan, J.; Pentieva, K. Impact of Continuing Folic Acid after the First Trimester of Pregnancy: Findings of a Randomized Trial of Folic Acid Supplementation in the Second and Third Trimesters. *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, *98*, 92–98. [[CrossRef](#)]
23. McNulty, H.; Rollins, M.; Cassidy, T.; Caffrey, A.; Marshall, B.; Dornan, J.; McLaughlin, M.; McNulty, B.A.; Ward, M.; Strain, J.J.; et al. Effect of Continued Folic Acid Supplementation beyond the First Trimester of Pregnancy on Cognitive Performance in the Child: A Follow-up Study from a Randomized Controlled Trial (FASSTT Offspring Trial). *BMC Med.* **2019**, *17*, 196. [[CrossRef](#)]
24. Caffrey, A.; McNulty, H.; Rollins, M.; Prasad, G.; Gaur, P.; Talcott, J.B.; Witton, C.; Cassidy, T.; Marshall, B.; Dornan, J.; et al. Effects of Maternal Folic Acid Supplementation during the Second and Third Trimesters of Pregnancy on Neurocognitive Development in the Child: An 11-Year Follow-up from a Randomised Controlled Trial. *BMC Med.* **2021**, *19*, 73. [[CrossRef](#)]
25. Guxens, M.; Ballester, F.; Espada, M.; Fernández, M.F.; Grimalt, J.O.; Ibarluzea, J.; Olea, N.; Rebagliato, M.; Tardón, A.; Torrent, M.; et al. Cohort Profile: The INMA—Infancia y Medio Ambiente—(Environment and Childhood) Project. *Int. J. Epidemiol.* **2012**, *41*, 930–940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gascon, M.; Guxens, M.; Vrijheid, M.; Torrent, M.; Ibarluzea, J.; Fano, E.; Llop, S.; Ballester, F.; Fernández, M.F.; Tardón, A.; et al. The INMA—Infancia y Medio Ambiente—(Environment and Childhood) Project: More than 10 Years Contributing to Environmental and Neuropsychological Research. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2017**, *220*, 647–658. [[CrossRef](#)]
27. Gonzalez-Palacios, S.; Navarrete-Muñoz, E.-M.; García-de-la-Hera, M.; Torres-Collado, L.; Santa-Marina, L.; Amiano, P.; Lopez-Espinosa, M.-J.; Tardon, A.; Riano-Galan, I.; Vrijheid, M.; et al. Sugar-Containing Beverages Consumption and Obesity in Children Aged 4–5 Years in Spain: The INMA Study. *Nutrients* **2019**, *11*, 1772. [[CrossRef](#)]
28. Vioque, J.; Navarrete-Muñoz, E.-M.; Gimenez-Monzó, D.; García-de-la-Hera, M.; Granado, F.; Young, I.S.; Ramón, R.; Ballester, F.; Murcia, M.; Rebagliato, M.; et al. Reproducibility and Validity of a Food Frequency Questionnaire among Pregnant Women in a Mediterranean Area. *Nutr. J.* **2013**, *12*, 26. [[CrossRef](#)]
29. U.S. Department of Agriculture (USDA). *Agriculture Research Service 2010 USDA National Nutrient Database for Standard Reference*; Release 23; Nutrient Data Laboratory: Washington, DC, USA, 2010.
30. Palma Linares, I.; Farran, A.; Cantós, D. *Tablas de Composición de Alimentos por Medidas Caseras de Consumo Habitual en España=Taules de Composició d'aliments per Mesures Casolanes de Consum Habitual a Espanya*; Universitat de Barcelona; McGraw-Hill-Interamericana: Barcelona, Madrid, 2008; ISBN 978-84-481-6090-6.
31. Owen, A.M.; McMillan, K.M.; Laird, A.R.; Bullmore, E. N-Back Working Memory Paradigm: A Meta-Analysis of Normative Functional Neuroimaging Studies. *Hum. Brain Mapp.* **2005**, *25*, 46–59. [[CrossRef](#)]
32. Forns, J.; Esnaola, M.; López-Vicente, M.; Suades-González, E.; Alvarez-Pedrerol, M.; Julvez, J.; Grellier, J.; Sebastián-Gallés, N.; Sunyer, J. The N-Back Test and the Attentional Network Task as Measures of Child Neuropsychological Development in Epidemiological Studies. *Neuropsychology* **2014**, *28*, 519–529. [[CrossRef](#)]
33. Sunyer, J.; Esnaola, M.; Alvarez-Pedrerol, M.; Forns, J.; Rivas, I.; López-Vicente, M.; Suades-González, E.; Foraster, M.; Garcia-Esteban, R.; Basagaña, X.; et al. Association between Traffic-Related Air Pollution in Schools and Cognitive Development in Primary School Children: A Prospective Cohort Study. *PLoS Med.* **2015**, *12*, e1001792. [[CrossRef](#)]
34. Deserno, L.; Sterzer, P.; Wustenberg, T.; Heinz, A.; Schlagenhaut, F. Reduced Prefrontal-Parietal Effective Connectivity and Working Memory Deficits in Schizophrenia. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 12–20. [[CrossRef](#)]

35. Rueda, M.R.; Fan, J.; McCandliss, B.D.; Halparin, J.D.; Gruber, D.B.; Lercari, L.P.; Posner, M.I. Development of Attentional Networks in Childhood. *Neuropsychologia* **2004**, *42*, 1029–1040. [[CrossRef](#)]
36. Thomason, M.E.; Race, E.; Burrows, B.; Whitfield-Gabrieli, S.; Glover, G.H.; Gabrieli, J.D.E. Development of Spatial and Verbal Working Memory Capacity in the Human Brain. *J. Cogn. Neurosci.* **2009**, *21*, 316–332. [[CrossRef](#)]
37. Suades-González, E.; Fornis, J.; García-Esteban, R.; López-Vicente, M.; Esnaola, M.; Álvarez-Pedrerol, M.; Julvez, J.; Cáceres, A.; Basagaña, X.; López-Sala, A.; et al. A Longitudinal Study on Attention Development in Primary School Children with and without Teacher-Reported Symptoms of ADHD. *Front. Psychol.* **2017**, *8*, 655. [[CrossRef](#)]
38. Arijia, V.; Hernández-Martínez, C.; Tous, M.; Canals, J.; Guxens, M.; Fernández-Barrés, S.; Ibarluzea, J.; Babarro, I.; Soler-Blasco, R.; Llop, S.; et al. Association of Iron Status and Intake During Pregnancy with Neuropsychological Outcomes in Children Aged 7 Years: The Prospective Birth Cohort Infancia y Medio Ambiente (INMA) Study. *Nutrients* **2019**, *11*, 2999. [[CrossRef](#)]
39. Gignac, F.; Solé, C.; Barrera-Gómez, J.; Persavento, C.; Tena, E.; López-Vicente, M.; Julvez, J.; Sunyer, J.; Couso, D.; Basagaña, X. Identifying Factors Influencing Attention in Adolescents with a Co-Created Questionnaire: A Citizen Science Approach with Secondary Students in Barcelona, Spain. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 8221. [[CrossRef](#)]
40. Antón, E.; Duñabeitia, J.A.; Estévez, A.; Hernández, J.A.; Castillo, A.; Fuentes, L.J.; Davidson, D.J.; Carreiras, M. Is There a Bilingual Advantage in the ANT Task? Evidence from Children. *Front. Psychol.* **2014**, *5*, 398. [[CrossRef](#)]
41. Yu, C.; Yao, W. Robust Linear Regression: A Review and Comparison. *Commun. Stat. Simul. Comput.* **2017**, *46*, 6261–6282. [[CrossRef](#)]
42. Nikoloulopoulos, A.K.; Karlis, D. On Modeling Count Data: A Comparison of Some Well-Known Discrete Distributions. *J. Stat. Comput. Simul.* **2008**, *78*, 437–457. [[CrossRef](#)]
43. Higgins, J.P.T.; Thompson, S.G.; Deeks, J.J.; Altman, D.G. Measuring Inconsistency in Meta-Analyses. *BMJ* **2003**, *327*, 557–560. [[CrossRef](#)]
44. Wu, K.; Taki, Y.; Sato, K.; Hashizume, H.; Sassa, Y.; Takeuchi, H.; Thyreau, B.; He, Y.; Evans, A.C.; Li, X.; et al. Topological Organization of Functional Brain Networks in Healthy Children: Differences in Relation to Age, Sex, and Intelligence. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55347. [[CrossRef](#)]
45. Wheelock, M.D.; Hect, J.L.; Hernandez-Andrade, E.; Hassan, S.S.; Romero, R.; Eggebrecht, A.T.; Thomason, M.E. Sex Differences in Functional Connectivity during Fetal Brain Development. *Dev. Cogn. Neurosci.* **2019**, *36*, 100632. [[CrossRef](#)]
46. Vioque, J.; Garcia-de-la-Hera, M.; Gonzalez-Palacios, S.; Torres-Collado, L.; Notario-Barandiaran, L.; Oncina-Canovas, A.; Soler-Blasco, R.; Lozano, M.; Beneito, A.; Navarrete-Muñoz, E.-M. Reproducibility and Validity of a Short Food Frequency Questionnaire for Dietary Assessment in Children Aged 7–9 Years in Spain. *Nutrients* **2019**, *11*, 933. [[CrossRef](#)]
47. Liu, H.-Y.; Liu, S.-M.; Zhang, Y.-Z. Maternal Folic Acid Supplementation Mediates Offspring Health via DNA Methylation. *Reprod. Sci.* **2020**, *27*, 963–976. [[CrossRef](#)]
48. Irwin, R.E.; Pentieva, K.; Cassidy, T.; Lees-Murdock, D.J.; McLaughlin, M.; Prasad, G.; McNulty, H.; Walsh, C.P. The Interplay between DNA Methylation, Folate and Neurocognitive Development. *Epigenomics* **2016**, *8*, 863–879. [[CrossRef](#)]
49. del Río García, C.; Torres-Sánchez, L.; Chen, J.; Schnaas, L.; Hernández, C.; Osorio, E.; Portillo, M.G.; López-Carrillo, L. Maternal MTHFR 677C>T Genotype and Dietary Intake of Folate and Vitamin B 12: Their Impact on Child Neurodevelopment. *Nutr. Neurosci.* **2009**, *12*, 13–20. [[CrossRef](#)]
50. Federico, F.; Marotta, A.; Martella, D.; Casagrande, M. Development in Attention Functions and Social Processing: Evidence from the Attention Network Test. *Br. J. Dev. Psychol.* **2017**, *35*, 169–185. [[CrossRef](#)]
51. Mullane, J.C.; Lawrence, M.A.; Corkum, P.V.; Klein, R.M.; McLaughlin, E.N. The Development of and Interaction among Alerting, Orienting, and Executive Attention in Children. *Child Neuropsychol.* **2016**, *22*, 155–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Vuontela, V.; Carlson, S.; Troberg, A.-M.; Fontell, T.; Simola, P.; Saarinen, S.; Aronen, E.T. Working Memory, Attention, Inhibition, and Their Relation to Adaptive Functioning and Behavioral/Emotional Symptoms in School-Aged Children. *Child Psychiatry Hum. Dev.* **2013**, *44*, 105–122. [[CrossRef](#)]
53. Anderson, P. Assessment and Development of Executive Function (EF) During Childhood. *Child Neuropsychol.* **2002**, *8*, 71–82. [[CrossRef](#)]
54. Vuontela, V.; Steenari, M.-R.; Aronen, E.T.; Korvenoja, A.; Aronen, H.J.; Carlson, S. Brain Activation and Deactivation during Location and Color Working Memory Tasks in 11–13-Year-Old Children. *Brain Cogn.* **2009**, *69*, 56–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. López-Vicente, M.; Fornis, J.; Suades-González, E.; Esnaola, M.; García-Esteban, R.; Álvarez-Pedrerol, M.; Julvez, J.; Burgaleta, M.; Sebastián-Gallés, N.; Sunyer, J. Developmental Trajectories in Primary Schoolchildren Using N-Back Task. *Front. Psychol.* **2016**, *7*, 716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Veena, S.R.; Krishnaveni, G.V.; Srinivasan, K.; Wills, A.K.; Muthayya, S.; Kurpad, A.V.; Yajnik, C.S.; Fall, C.H.D. Higher Maternal Plasma Folate but Not Vitamin B-12 Concentrations during Pregnancy Are Associated with Better Cognitive Function Scores in 9-to 10-Year-Old Children in South India. *J. Nutr.* **2010**, *140*, 1014–1022. [[CrossRef](#)]
57. Caffrey, A.; Irwin, R.E.; McNulty, H.; Strain, J.J.; Lees-Murdock, D.J.; McNulty, B.A.; Ward, M.; Walsh, C.P.; Pentieva, K. Gene-Specific DNA Methylation in Newborns in Response to Folic Acid Supplementation during the Second and Third Trimesters of Pregnancy: Epigenetic Analysis from a Randomized Controlled Trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2018**, *107*, 566–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Deoni, S.C.L.; Dean, D.C.; O’Muircheartaigh, J.; Dirks, H.; Jersey, B.A. Investigating White Matter Development in Infancy and Early Childhood Using Myelin Water Fraction and Relaxation Time Mapping. *NeuroImage* **2012**, *63*, 1038–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

59. Vuontela, V.; Steenari, M.-R.; Carlson, S.; Koivisto, J.; Fjällberg, M.; Aronen, E.T. Audiospatial and Visuospatial Working Memory in 6–13 Year Old School Children. *Learn. Mem.* **2003**, *10*, 74–81. [[CrossRef](#)]
60. Pelegrina, S.; Lechuga, M.T.; García-Madruga, J.A.; Elosúa, M.R.; Macizo, P.; Carreiras, M.; Fuentes, L.J.; Bajo, M.T. Normative Data on the N-Back Task for Children and Young Adolescents. *Front. Psychol.* **2015**, *6*, 1544. [[CrossRef](#)]
61. Maruvada, P.; Stover, P.J.; Mason, J.B.; Bailey, R.L.; Davis, C.D.; Field, M.S.; Finnell, R.H.; Garza, C.; Green, R.; Gueant, J.-L.; et al. Knowledge Gaps in Understanding the Metabolic and Clinical Effects of Excess Foliates/Folic Acid: A Summary, and Perspectives, from an NIH Workshop. *Am. J. Clin. Nutr.* **2020**, *112*, 1390–1403. [[CrossRef](#)]
62. Balart, P.; Oosterveen, M. Females Show More Sustained Performance during Test-Taking than Males. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3798. [[CrossRef](#)]
63. Navarrete-Muñoz, E.M.; Valera-Gran, D.; Garcia-de-la-Hera, M.; Gonzalez-Palacios, S.; Riaño, I.; Murcia, M.; Lertxundi, A.; Guxens, M.; Tardón, A.; Amiano, P.; et al. High Doses of Folic Acid in the Periconceptional Period and Risk of Low Weight for Gestational Age at Birth in a Population Based Cohort Study. *Eur. J. Nutr.* **2019**, *58*, 241–251. [[CrossRef](#)]
64. Pastor-Valero, M.; Navarrete-Muñoz, E.M.; Rebagliato, M.; Iñiguez, C.; Murcia, M.; Marco, A.; Ballester, F.; Vioque, J. Periconceptional Folic Acid Supplementation and Anthropometric Measures at Birth in a Cohort of Pregnant Women in Valencia, Spain. *Br. J. Nutr.* **2011**, *105*, 1352–1360. [[CrossRef](#)]
65. Husebye, E.S.N.; Wendel, A.W.K.; Gilhus, N.E.; Riedel, B.; Bjørk, M.H. Plasma Unmetabolized Folic Acid in Pregnancy and Risk of Autistic Traits and Language Impairment in Antiepileptic Medication-Exposed Children of Women with Epilepsy. *Am. J. Clin. Nutr.* **2022**, nqab436. [[CrossRef](#)]
66. Papadopoulou, E.; Stratakis, N.; Roumeliotaki, T.; Sarri, K.; Merlo, D.F.; Kogevinas, M.; Chatzi, L. The Effect of High Doses of Folic Acid and Iron Supplementation in Early-to-Mid Pregnancy on Prematurity and Fetal Growth Retardation: The Mother–Child Cohort Study in Crete, Greece (Rhea Study). *Eur. J. Nutr.* **2013**, *52*, 327–336. [[CrossRef](#)]
67. Czeizel, A.E.; Vereczkey, A.; Szabó, I. Folic Acid in Pregnant Women Associated with Reduced Prevalence of Severe Congenital Heart Defects in Their Children: A National Population-Based Case-Control Study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2015**, *193*, 34–39. [[CrossRef](#)]
68. Mavrogenis, S.; Urban, R.; Czeizel, A.E.; Ács, N. Possible Preventive Effect of High Doses of Folic Acid for Isolated Hypospadias: A National Population-Based Case-Control Study. *Am. J. Med. Genet. A* **2014**, *164*, 3108–3114. [[CrossRef](#)]
69. Chatzi, L.; Papadopoulou, E.; Koutra, K.; Roumeliotaki, T.; Georgiou, V.; Stratakis, N.; Lebentakou, V.; Karachaliou, M.; Vassilaki, M.; Kogevinas, M. Effect of High Doses of Folic Acid Supplementation in Early Pregnancy on Child Neurodevelopment at 18 Months of Age: The Mother-Child Cohort “Rhea” Study in Crete, Greece. *Public Health Nutr.* **2012**, *15*, 1728–1736. [[CrossRef](#)]
70. Julvez, J.; López-Vicente, M.; Warembourg, C.; Maitre, L.; Philippat, C.; Gützkow, K.B.; Guxens, M.; Evandt, J.; Andrusaityte, S.; Burgaleta, M.; et al. Early Life Multiple Exposures and Child Cognitive Function: A Multi-Centric Birth Cohort Study in Six European Countries. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* **2021**, *284*, 117404. [[CrossRef](#)]
71. Sagiv, S.K.; Thurston, S.W.; Bellinger, D.C.; Altshul, L.M.; Korrick, S.A. Neuropsychological Measures of Attention and Impulse Control among 8-Year-Old Children Exposed Prenatally to Organochlorines. *Environ. Health Perspect.* **2012**, *120*, 904–909. [[CrossRef](#)]
72. Herzog, A.G.; MacEachern, D.B.; Mandle, H.B.; Cahill, K.E.; Fowler, K.M.; Davis, A.R.; Allen Hauser, W. Folic Acid Use by Women with Epilepsy: Findings of the Epilepsy Birth Control Registry. *Epilepsy Behav.* **2017**, *72*, 156–160. [[CrossRef](#)]
73. Cai, S.; Quan, S.; Yang, G.; Chen, M.; Ye, Q.; Wang, G.; Yu, H.; Wang, Y.; Qiao, S.; Zeng, X. Nutritional Status Impacts Epigenetic Regulation in Early Embryo Development: A Scoping Review. *Adv. Nutr.* **2021**, *12*, 1877–1892. [[CrossRef](#)]
74. Li, M.; Francis, E.; Hinkle, S.N.; Ajjarapu, A.S.; Zhang, C. Preconception and Prenatal Nutrition and Neurodevelopmental Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* **2019**, *11*, 1628. [[CrossRef](#)]
75. Clare, C.E.; Pestinger, V.; Kwong, W.Y.; Tutt, D.A.R.; Xu, J.; Byrne, H.M.; Barrett, D.A.; Emes, R.D.; Sinclair, K.D. Interspecific Variation in One-Carbon Metabolism within the Ovarian Follicle, Oocyte, and Preimplantation Embryo: Consequences for Epigenetic Programming of DNA Methylation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1838. [[CrossRef](#)]

## AGRADECIMIENTOS

---

Parecía que no iba a llegar nunca este momento, el momento de mostrar mi agradecimiento a todas las personas que me habéis hecho más fácil el camino para llegar hasta este instante.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directoras de tesis; Manuela García de la Hera y Laura Torres Collado; y a mi tutor de tesis, Jesús Vioque; pues sin ellos no hubiera podido terminar este trabajo, espero haber estado a la altura y haber cumplido todas vuestras expectativas como doctoranda. Manoli, necesito que sepas que eres un referente para mí, tanto profesional como personalmente. Profesionalmente, fuiste la primera que me involucró en docencia y proyectos, mostrándome y dándome una confianza absoluta, que me ha ayudado mucho a crecer, a aprender y a mejorar en mi carrera profesional. Personalmente, me has animado, me has dado fuerza, cercanía, consejos y seguridad, sabiendo en cada momento qué me pasaba y cómo solucionarlo, me has enseñado a relativizar y a enfrentarme a ciertas situaciones incómodas que han surgido en mi vida, especialmente este último año. Por todo ello, y más, muchas gracias de corazón. Laura, ha sido un orgullo ser tu primera alumna de tesis. Además de codirectora, eres amiga y compañera de trabajo, aunque he de decir, que has sabido separar todas las facetas a la perfección. Y te doy las gracias por eso. No has dejado que me distraiga ni me estanque, me has apoyado y levantado cada vez que lo he necesitado, incluso cuando ni yo misma lo sabía. Gracias por todos tus gestos de ánimo y empatía, por escucharme, por preocuparte, por querer verme siempre feliz y por tenerme siempre en cuenta. Espero poder seguir disfrutando de todo eso durante mi etapa postdoctoral, mil gracias por tu inmensa confianza y ayuda. Jesús, muchas gracias por tu confianza en mí durante toda la etapa predoc, pero en especial gracias por tu preocupación, comprensión, ayuda y apoyo durante todo este último año. Gracias por contar conmigo como una EPINUT más desde que empecé en 2014, por todo lo que me has enseñado tanto de epidemiología como de redacción de artículos, y muchísimas gracias por tus palabras de ánimo cada vez que me pongo nerviosa antes de una presentación. No he podido tener mejor dirección de tesis, os estoy muy agradecida a los tres.

En segundo lugar, quiero daros las gracias al resto de vosotros, EPINUTs. Todos los EPINUTs, actuales y esporádicos, habéis estado atentos y presentes a lo largo de mi doctorado. Me habéis apoyado y ayudado, me habéis tranquilizado cuando parecía imposible, cuando me he bloqueado y cuando he estado esperando las respuestas de los revisores. Álex, gracias por nuestras charlas matutinas cinco minutos antes de empezar a trabajar, por resolver todas mis dudas (y las de mi familia) en cuanto a alimentación saludable, por ser el primero en decir “ella no puede tomar eso, pero sí esto” cuando hemos estado en algún bar o restaurante y por empatizar tanto con mi situación. Espero que nuestra amistad no cambie y que me dediques unas palabras tan bonitas como las mías en tu tesis (que está muy muy cerca, ¡ánimo!). Sandra, gracias por tus abrazos con consentimiento, por acordarte de mí y buscar si hay apartado de enfermedades inflamatorias cada vez que lees un libro de dieta, por tu dislexia ocasional en los cuestionarios que me mantiene siempre alerta y por tener unos principios y valores tan claros, Martín ha tenido mucha suerte con su mamá. Leyre, mi compañera de despacho y amiga, cuánto te voy a echar de menos en tu nueva etapa, qué valiente eres. Gracias por tu creatividad,

organización y bolis de colores; por nuestras charlas para hacer un “break” durante la jornada, por reírte de todo y por no preocuparte en exceso; nos equilibramos mucho y dejas el listón muy alto como vecina de mesa. Te deseo muchísima suerte en esta nueva etapa de tu carrera investigadora. Para terminar, os tengo que volver a dar las gracias por el cumple tan especial que me organizasteis, me encantó, fue una sorpresa preciosa, ¡sois los mejores, EPINUTs!

No puede faltar el agradecimiento a mis amigos, que quizá ellos no lo creen o no lo han pensado, pero me han ayudado mucho durante la etapa predoc, porque una parte muy difícil durante este tiempo es la desconexión y en eso ellos, han sido clave. Marta y Antonio, gracias por sacarme una sonrisa cada vez que nos vemos. Marta, muchas gracias por estar siempre tan cerca a pesar de la distancia, por preocuparte por mí y por animarme con la tesis como si fuera una carrera de fondo. Gracias por tus palabras de ánimo, que son maravillosas y especiales, espero que sigas dándomelas siempre. Hieron, Lydia y Sigrid, gracias por insistir en vernos, por preguntar siempre que nos vemos “¿cómo va la tesis?” y por preocuparos por mí; espero que no cambiemos y me perdonéis por haber estado tan ausente. Vero, gracias por hacerme una más de vuestras quedadas en la terracita, por compartir nuestras preocupaciones y por cabrearte cuando me veías desanimada con la tesis; gracias por darme fuerzas. Jeza, muchas gracias por tenerme en agenda siempre, por acordarte de mí, por los WhatsApp para ver cómo voy, por acordarte de todo lo que me hacen y dicen en cada visita al médico, por nuestras risas, porque tu nombre rime con enfermera y por nuestra amistad, que espero no cambie nunca.

Un pilar fundamental, especialmente emocional, ha sido mi familia, a la que adoro. Mamá, ¡qué haría yo sin ti! Vaya año de preocupaciones que te estoy dando... pero mira el lado bueno, por fin estoy terminando la tesis. Gracias por tus abrazos, que me recargan las pilas y me hacen feliz. Gracias por tu infinita preocupación, por cada uno de los “¿cómo va el doctorado?” que me has preguntado, por las comidas deliciosas que haces cada sábado, por empatizar hasta la médula conmigo, por quererme tanto, por ver los programas de novias y reformas de casas juntas y por tu omnipresencia a través de WhatsApp, que nunca permite que me sienta sola. No hay palabras para agradecer el apoyo, cariño y amor que me has dado siempre, gracias infinitas, te quiero mucho, mamá. Héctor, gracias por tus palabras, opiniones y consejos, claros como el agua. Por preocuparte por mí como el que más, por interesarte en lo que hago y asistir a las exposiciones por meet durante el programa de doctorado para darme apoyo moral. Gracias por la certeza de saber que podemos contar el uno con el otro en cualquier momento y circunstancia, por hacerme ver que puedo con todo y que a veces, debería ser un poco más como tú. Gracias por nuestras miradas cómplices cuando vamos a hacer alguna broma, pero nos reímos antes de tiempo, sin haberla hecho, tenemos a mamá frita. Esas risas han logrado que me despreocupe y vuelva con más fuerzas a hacer frente a la tesis cada vez que lo he necesitado, un millón de gracias. Inma y papá, a los dos, muchísimas gracias por alegraros cada vez que os doy una buena noticia sobre la tesis, por sentirnos orgullosos, por subirme la autoestima que a veces me hace mucha falta y por vuestro inmenso apoyo. Papá, gracias por tu cariño cada vez que nos vemos, por tu preocupación, por tus “te quiero mucho, hija”, por tus abrazos, por tus chistes súper malos, por tu risa contagiosa... estoy segura de que vas a ser un profe genial y de que tus estudiantes te van a adorar. Isa y Rosa, gracias por tratarme como una más desde el principio, por preocuparos por mi salud, por vuestra comprensión y por la alegría e ilusión que me habéis mostrado cada vez que he publicado un

artículo, simplemente por saber que era muy importante para mí. Muchas, muchas gracias. Isa, mi compañera de vida, lo compartimos todo, gathijos, amor, penas y alegrías. Muchas gracias por tu paciencia, especialmente durante este último año, por amoldarte a mi nuevo estilo de vida, por preocuparte tanto o más que yo de mí misma y por cuidarme tan bien. Gracias por dedicar gran parte del poco tiempo libre que tienes a idear (y hacer) distintos postres y dulces que yo pueda tomar con tranquilidad. Gracias por tu compañía, ánimo, fuerzas y apoyo durante toda la tesis, por ver siempre el vaso medio lleno, que me hace mucha falta; y por no dejar que tirase la toalla, aunque he de decir que en esto último te han ayudado mucho Cotton Ball, Pelusa y Azabache, que han estado encima de mí, literalmente, durante toda la redacción de artículos y tesis. Muchísimas gracias.

Estoy muy convencida de que, sin todos vosotros, no hubiera logrado terminar este proceso.

Muchas gracias a todos, de nuevo, una y mil veces.



