INDICE

INTRODUZIONE

1. L'anemia..... 5

1.1 Emoglobina..... 5

1.2 Ematocrito..... 6

1.3 MCV, MCH..... 6

1.4 Eritropoiesi..... 6

1.5 Reticolociti..... 7

1.6 Eritropoietina..... 7

1.7 Meccanismi do compenso dell'anemia..... 8

1.8 Classificazione fisiopatologica delle anemie..... 8

1.9 Sintomi e segni del paziente anemico..... 9

2. L'anemia nel paziente anziano..... 10

2.1 Importanza clinica dell'anemia nell'anziano..... 10

2.2 Cause di anemia nell'anziano..... 12

2.2.1 Anemia sideropenica..... 12

2.2.2 Anemia da deficit di vitamina B_{12} e acido folico..... 12

2.2.3 Anemia da flogosi cronica..... 13

2.2.4 Anemia da malattia renale..... 15

2.2.5 Mielodisplasia (MDS) e neoplasie ematologiche..... 15

2.2.6 Anemia da cause sconosciute..... 16

3. La vitamina B_{12} o cobalamina..... 17

3.1 Forme chimiche 17

3.2 Fonti alimentari..... 17

3.3 Assorbimento, trasporto e deposito..... 17

3.4 Struttura e funzioni fisiologiche 20

4. Il deficit di vitamina B_{12} 22

4.1 Correlazione tra deficit di vitamina B_{12} e folato..... 22

4.2 Biomarkers per la diagnosi di deficit di vitamina B_{12}..... 23

4.2.1 Concentrazione di vitamina B_{12} totale nel siero.....23

4.2.2 Concentrazione di omocisteina nel plasma..... 24

4.2.3 Concentrazione di metilmalonato nel siero..... 24

4.2.4 Concentrazione di olotranscobalamina nel siero..... 25

5. Il deficit di vitamina B_{12} nel paziente anziano 26

5.1 Il deficit di vitamina B_{12} nell'anziano istituzionalizzato 26

5.2 Cause di deficit di vitamina B_{12} nell'anziano..... 27

5.2.1 Inadeguato apporto con la dieta..... 27

5.2.2 Malassorbimento..... 27

5.2.2.1 Anemia perniciosa..... 27

5.2.2.2 Malassorbimento di vitamina B_{12} di origine alimentare..... 28

5.2.2.3 Malassorbimento di vitamina B_{12} causato inibitori di pompa protonica..... 29

5.2.2.4 Resezione gastrica o intestinale e malattie intestinali.... 29

5.2.3 Polimorfismi genetici..... 30

5.2.4 Altre cause..... 30

5.3 Manifestazioni cliniche del deficit di vitamina B_{12} 32

5.3.1 Manifestazioni ematologiche..... 32

5.3.2 Manifestazioni neurologiche..... 32

5.3.3 Manifestazioni digestive..... 32

5.4 Vitamina B_{12} e patologie correlate all'età..... 35

5.4.1 Rischio cardiovascolare..... 35
5.4.2 Deterioramento cognitivo..... 35
5.4.3 Osteoporosi..... 36
5.5 Deficit subclinico di vitamina B_{12}..... 36
5.6 Diagnosi del deficit di vitamina B_{12}..... 36
5.6.1Screening per il deficit di vitamina B_{12}..... 37
5.7 Trattamento del deficit di vitamina B_{12}..... 37

6. L'acido folico 39
6.1 Fonti alimentari..... 39
6.2 Assorbimento, trasporto e escrezione..... 40
6.3 Funzioni fisiologiche..... 40

7. Il deficit di acido folico..... 42
7.1 Folato-cobalamina e omocisteina..... 42

8. Il deficit di acido folico nell'anziano..... 43
8.1 Cause di deficit di acido folico nell'anziano..... 43
8.2 Manifestazioni cliniche del deficit di acido folico..... 44
8.2.1 Manifestazioni ematologiche..... 44
8.2.2 Sintomi neuropsichiatrici..... 44
8.2.3 Sintomi neurologici..... 45
8.2.4 Rischio cardiovascolare..... 45
8.2.5 Tumori..... 45
8.3 Diagnosi del deficit di folato..... 46
8.4 Trattamento del deficit di folato..... 46

PARTE SPERIMENTALE

1. **Introduzione e scopo dello studio..... 48**
2. **Materiali e metodi..... 50**

   2.1 Analisi statistica.....50

3. **Risultati..... 51**
4. **Discussione..... 66**
5. **Conclusioni..... 68**

BIBLIOGRAFIA..... 69

INTRODUZIONE

1. L'anemia

Per anemia (dal greco ἀναιμία, anaimìa, «senza sangue») si intende una riduzione del patrimonio emoglobinico dell'organismo, che determina una ridotta capacità del sangue di trasportare l'ossigeno[1].
Secondo i cirteri della WHO, si parla di anemia quando i valori di emoglobina scendono al di sotto di 13g/dL nell'uomo e 12 g/dL nella donna[2]. L'anemia è lieve quando l'emoglobina è al di sopra dei 10g/dL, moderata quando è al di sotto di 10g/dL e grave quando è al di sotto di 8g/dL[1].

In una condizione fisiologica come la gravidanza, in cui il volume circolante aumenta, si potrà avere una falsa anemia. In gravidanza può esserci anemia vera, ma per farne diagnosi è necessario correggere il contenuto emoglobinico per il volume circolante[3].
Quando invece vi è emoconcentrazione, ad esempio nel caso di emorragia acuta o in caso di grave disidratazione, si potrebbero avere valori di Hb di 16 gr/dL che non fanno pensare ad un'anemia, tuttavia l'anemia potrebbe esserci perché il volume di sangue è ridotto.
Bisogna quindi fare attenzione ai valori di emoglobina nei pazienti iperidratati, in gravidanza, disidratati, o che hanno avuto un'emorragia[4].

1.1 Emoglobina

L'emoglobina è una globulina formata da 4 monomeri; vi è un anello porfirinico contenente un atomo di ferro. È deputata al trasporto di ossigeno e nell'adulto è formata da 2 catene α e 2 catene β ($\alpha_2\beta_2$)[4].

1.2 Ematocrito

Per ematocrito si intende la percentuale di volume ematico occupata dagli eritrociti, il suo valore normale va dal 36% al 48% nelle donne, e dal 40% al 52% negli uomini[4].

1.3 MCV, MCH

L'MCV (mean corpuscolar volume) è il volume corpuscolare medio, cioè il volume medio degli eritrociti e viene calcolato facendo il rapporto tra ematocrito e numero di eritrociti. I valori normali di MCV sono compresi tra 80 e 95 fl.
Nel soggetto anemico l'MCV è importante perchè ci permette di classificare l'anemia: al di sotto degli 80fl si parlerà di anemia microcitica, tra gli 80 e i 95 fl di anemia normocitica e al di sopra dei 95fl di anemia macrocitica[5].

L'MCH (Mean Corpuscolar Hemoglobin) è il contenuto medio di emoglobina e i suoi valori normali sono tra i 27 e i 34 picogrammi[5].

1.4 Eritropoiesi

L'eritropoiesi avviene nel midollo, parte dal momento in cui la stem multipotente dà origine ad un progenitore commissionato per la serie eritroide.
Dal più immaturo al meno immaturo, i progenitori si dividono in: proeritroblasto, eritroblasto basofilo, policromatofilo, ortocromatico[6].
L'eritroblasto basofilo non ha Hb ma ha molto RNA endoplasmatico perché sintetizza proteine. La cromatina è ancora dispersa con basofilia intensa del citoplasma, indice di forte sintesi proteica.
Nell'eritroblasto policromatofilo iniziano a comparire delle gradazioni di colore leggermente piu rossastre, poi ben evidenti nell'eritroblasto ortocromatico, che ha gia sintetizzato l'Hb per cui è di colore rosso, molto simile all'eritrocita.
Al momento in cui l'eritroblasto ortocromatico perde il nucleo si ha il reticolocita, ovvero un eritrocita immaturo appena immesso in circolo[6].

Gli eritrociti maturi sono dischi biconcavi di circa 8 μm di diametro. Il loro numero va da 4,5 a 6,5 milioni per microlitro negli uomini, e da 3,9 a 5,6 milioni per microlitro nelle donne. La vita media di un eritrocita è di 120 giorni[7].

1.5 Reticolociti

I reticolociti sono degli eritrociti giovani privi di nucleo, che sono stati appena immessi in circolo. Costituiscono lo 0,5-2% degli eritrociti in circolo, il range normale è tra i 20.000 e gli 80.000/μL[7].

Se vi è un'anemia con pochi reticolociti vuol dire che c'è un problema nel midollo osseo, perché se il midollo fosse funzionante produrrebbe tanti reticolociti per un meccanismo di compenso. Se il numero di reticolociti è basso si parla di anemia iporigenerativa.
Se invece i reticolociti sono aumentati si parla di anemia iperigenerativa: il midollo osseo risponde bene[1].

1.6 Eritropoietina

L'eritropoietina (EPO) è prodotta da cellule monocito-macrofagiche del rene, è una proteina circolante che risponde alle cadute di pressione dell'ossigeno (pO2, pressione parziale di ossigeno dei tessuti periferici): abbassamenti di pO2 vengono percepiti a livello renale da cellule specializzate, si ha la sintesi di HIF (hypoxia inducible factors) con conseguente aumento di sintesi di EPO[8].
La concentrazione di eritropoietina nel sangue è inversamente correlata ai livelli di emoglobina: l'eritropoietina aumenta se i livelli di emoglobina sono bassi. Meno emoglobina c'è, minore è la pO2, più aumenta la produzione di eritropoietina.
In condizioni di necessità , ad esempio in seguito ad emorragia acuta, la produzione di eritrociti può aumentare fino a 6-7 volte in risposta all'incremento

dell'eritropoietina[8].

1.7 Meccanismi di compenso dell'anemia

I meccanismi di compenso sono diversi se l'anemia si instaura acutamente, ad esempio un'emorragia, oppure lentamente, ad esempio un lento stillicidio ematico del tratto gastrointestinale.

Un'anemizzazione cronica consente all'organismo di adattarsi, mentre il soggetto con anemia acuta sviluppa rapidamente sintomi.

Il primo compenso che si ha sia in un'anemia è l'aumento della gittata cardiaca, che è proporzionale alla riduzione dell'emoglobina, e si associa a un aumento della velocità del circolo.

Un altro meccanismo di compenso è la vasocostrizione cutanea, che ha lo scopo di redistribuire l'ossigeno da organi meno importanti a organi più importanti (cervello, cuore, fegato ecc.).

Altro meccanismo è lo spostamento della curva di dissociazione dell'emoglobina verso destra, ovvero una ridotta affinità dell'emoglobina per l'ossigeno. In corso di anemia si accentua il fenomeno fisiologico del legame del 2,3 BPG all'emoglobina, in questo modo l'emoglobina perde affinità per l'ossigeno e tutto l'ossigeno che ha lo rilascia ai tessuti.

Si avrà poi l'aumento della ventilazione alveolare per aumentare l'ossigenazione dell'emoglobina a livello del circolo polmonare.

Infine si avrà l'aumento della sintesi dell'eritropoietina a livello renale[9].

1.8 Classificazione fisiopatologica delle anemie

Le anemie possono essere classificate in 4 gruppi:

- I gruppo: anemie aplastiche o da ridotta eritroblastogenesi: il midollo non produce eritroblasti. L'aplasia midollare può essere selettiva della serie rossa (PRCA) o più spesso coinvolge anche le altre serie mieloidi (pancitopenia).

Sono anemie normocitiche normocromiche, con pochi reticolociti (iporigenerative).

- II gruppo: anemie diseritropoietiche: eritropoiesi inefficace, ridotta eritocitogenesi. I progenitori ci sono ma non maturano, si accumulano eritroblasti. Sono anemie macrocitiche e iporigenerative.

  Di questo gruppo fanno parte:

  - forme congenite tra cui la Talassemia Major e la Sindrome di Fanconi;
  - forme acquisite che possono essere clonali (legate ad un'alterazione genetica acquisita, sono sindromi mielodisplastiche) o non clonali (causate dalla carenza di sostanze che permettono la maturazione degli eritrociti come la vitamina B_{12} o l'acido folico, oppure da farmaci).
- III gruppo: ridotta sintesi dell'emoglobina: si avrà anemia microcitica ipocromica. Di questo gruppo fanno parte le anemie sideropeniche, le emoglobinopatie (talassemie e drepanocitosi), le anemie da flogosi cronica (ACD) e le anemie da carenza proteica grave.
- IV gruppo: ridotta sopravvivenza eritrocitaria: anemie emolitiche. In queste anemie l'emivita del globulo rosso è ridotta al di sotto dei 20 giorni (al di sopra dei 20 giorni il midollo è in grado di compensare). Si ha un aumento dei reticolociti[9].

1.9 Sintomi e segni del paziente anemico

La sintomatologia può essere varia: debolezza, astenia, letargia, dispnea soprattutto dopo sforzo, cardiopalmo, dolore retrosternale, perdita della memoria, insonnia, irritabilità, depressione.

I segni possono essere: pallore cutaneo e mucoso, tachicardia, tachipnea, ipotensione, glossite, chelite[10].

2. L'anemia nel paziente anziano

L'anemia è frequente nell'anziano: colpisce circa il 17% dei soggetti di età maggiore di 65 anni[11]. I grandi anziani ricoverati in ospedale sono più spesso anemici (40%) e la prevalenza di anemia è ancora più alta (47%) negli anziani nelle case di riposo[12,13].

Secondo i criteri WHO, l'anemia è definita da un livello di emoglobina minore di 13g/dL negli uomini, e minore di 12g/dL nelle donne [14].

Tuttavia un sistema alternativo potrebbe essere quello di definire l' anemia correlando le concentrazioni di emoglobina agli esiti clinici negli anziani, infatti sono state dimostrate correlazioni tra gli esiti sfavorevoli e i livelli di emoglobina[13]. Ad esempio, nel Cardiovascular Health Study (CHS) è stato dimostrato che livelli di emoglobina >13,7g/dL nell'uomo e >12,6g/dL nella donna correlano con una maggiore sopravvivenza. Inoltre i livelli ottimali di emoglobina per evitare l'ospedalizzazione e la mortalità sono tra i 13 e i 15g/dL per le donne, e tra i 14 e i 17g/dL per gli uomini[13].

Perciò gli autori ritengono che la definizione di anemia fornita dalla WHO dovrebbe essere utilizzata per la classificazione generale dell'anemia nell'anziano, inoltre dovrebbero essere considerati i livelli di emoglobina che si associano a migliori esiti clinici[13] .

2.1 Importanza clinica dell'anemia nell'anziano

Nonostante generalmente si tratti di un'anemia lieve[2] , l'anemia nell'anziano è spesso associata ad un peggioramento delle condizioni cliniche tra cui: malattie cardiovascolari[15] , deterioramento cognitivo[16], insonnia, riduzione della qualità della vita, aumentato rischio di cadute e fratture, ospedalizzazione più frequente[13].

Inoltre molte evidenze suggeriscono che l'anemia determini un aumento della **mortalità**. La domanda principale è se sia l'anemia di per sé a determinare esiti sfavorevoli, oppure se l'anemia è un marker di sottostanti patologie come l'infiammazione o la malattia renale cronica.

Negli studi effettuati è stata analizzata una possibile associazione tra anemia e mortalità, corretta per fattori confondenti quali markers infiammatori o malattia renale cronica. A supporto della teoria dell'effetto avverso additivo di anemia e patologie sottostanti, la mortalità più alta è stata trovata nelle anemie da deficit nutrizionali (deficit di ferro, vitamina B_{12} e folato), malattia renale cronica e infiammazione cronica, rispetto all'anemia da causa indeterminata[13].

Per quanto riguarda l'**ospedalizzazione**, è stato effettuato uno studio osservazionale prospettico su un totale di 884 pazienti anemici di età maggiore di 70 anni per valutare, un anno dopo un ricovero per causa acuta, qual era la frequenza di un nuovo ricovero ospedaliero e la mortalità.

Questi soggetti ospedalizzati per causa acuta sono stati trasferiti in una casa di ricovero, e lì sono stati effettuati esami di laboratorio per valutare l'anemia. Sono stati divisi in 3 gruppi: pazienti senza anemia, pazienti con anemia da causa nota (insufficienza renale, sideropenia, deficit di vitamina B_{12} o folato) e pazienti con anemia da causa non nota.

I pazienti con anemia da causa nota, rispetto ai pazienti con anemia da causa non nota, più spesso morivano o venivano di nuovo ricoverati. Inoltre i pazienti con anemia da causa nota, rispetto ai pazienti senza anemia, venivano più spesso ricoverati nuovamente.

I pazienti con anemia da causa non nota invece non avevano aumentato rischio di nuovo ricovero nè di morte. Perciò si ritiene che, in questa categoria di pazienti, non siano necessarie ulteriori indagini invasive per indagare la causa dell'anemia.

Un follow up clinico ravvicinato potrebbe essere il miglior modo per gestire questi pazienti con lieve anemia da causa non nota[17].

2.2 Cause di anemia nell'anziano

Molte patologie sottostanti come i tumori, la sindrome mielodisplastica, le malattie renali croniche o alcune malattie gastrointestinali sono frequenti nel soggetto anziano. In alcuni pazienti ci potrebbe anche essere una concomitanza di cause[18]. Identificare la causa dell'anemia nell'anziano è importante per una terapia adeguata[2].

2.2.1 Anemia sideropenica

L'anemia sideropenica nell'anziano può essere causata da deficit nutrizionali, o più frequentemente da sanguinamenti[2].

Nel primo caso, la malnutrizone nell'anziano può essere causata da numerosi fattori età-dipendenti quali alterazioni del tratto gastrointestinale, polifarmacoterapia e isolamento sociale[19].

Nel secondo caso sono necessari approfondimenti diagnostici per indagare la sede di tali sanguinamenti[20,21]. L'endoscopia gastrointestinale effettuata su 100 pazienti con anemia sideropenica ha dimostrato che il 62% dei pazienti aveva una lesione che poteva determinare perdita di sangue, mentre il 16% aveva polipi premaligni o cancro del colon. Anche farmaci come l'acido acetilsalicilico e gli anticoagulanti orali possono contribuire ai sanguinamenti[22].

Diagnosticare l'anemia sideropenica nell'anziano è difficile perché la concentrazione plasmatica della ferritina aumenta con l'età e con le malattie associate all'età[23]. Uno studio condotto su pazienti ospedalizzati di età maggiore di 80 anni ha mostrato che gli esami ematici di routine della sideremia, ferritina e

saturazione della transferrina avevano scarsa sensibilità come screening per identificare soggetti sideropenici[24].

Nonostante il metodo più sensibile sia l'indice sTFR/log ferritin[25], la sua applicazione è ostacolata dalla mancanza di reagenti standardizzati per il dosaggio del sTFR[2].

Il gold standard per la diagnosi di anemia sideropenica è l'assenza di ferro all'aspirato midollare (tuttavia questo è un metodo invasivo, raramente utilizzato al solo scopo di diagnosticare un'anemia sideropenica)[26], oppure un franco aumento dell'emoglobina in seguito alla somministrazione di ferro[2].

2.2.2 Anemia da deficit di vitamina B_{12} e acido folico

L'anemia da deficit di vitamina B_{12} e acido folico sarà trattata nel dettaglio più avanti (Capitoli 4, 5, 7 e 8).

2.2.3 Anemia da flogosi cronica

Tra le principali cause di flogosi cronica nell'anziano vi sono tumori, malattie autoimmuni e infezioni croniche[13].

Per quanto riguarda i meccanismi fisiopatologici, avremo:

- una riduzione della produzione di eritropoietina e una ridotta risposta dei progenitori eritroidi all'eritropoietina: vi è un effetto negativo di varie citochine (IL1, TNF) sulla proliferazione dei progenitori eritroidi e sulla produzione di eritropoietina[27];
- l'intrappolamento del ferro a livello del sistema reticoloendoteliale, con conseguente riduzione dell'eritropoiesi da carenza di ferro[28]. L'epcidina, una

proteina di fase acuta prodotta dal fegato, riduce sia l'assorbimento duodenale di ferro sia il rilasicio di ferro dai macrofagi. L'epcidina inoltre aumenta con l'età[29];

- la fagocitosi degli eritrociti invecchiati (eryptosis), scatenata da modificazioni di membrana: si ha la traslocazione della fosfatidilserina sulla membrana cellulare[30], che permette ai macrofagi di fagocitare gli eritrociti. La produzione di ROS determina un aumento della frequenza degli eritrociti presentanti fosfatidilserina negli anziani, rispetto ai soggetti più giovani[31].

Il termine "inflammaging" è usato per descrivere un basso grado di infiammazione cronica associato all'invecchiamento e all'immunosenescenza, caratterizzato da aumentati livelli di citochine proinfiammatorie quali IL-1, IL-6 e TNF[32].

La diagnosi di anemia da flogosi cronica è una diagnosi difficile da fare per la variabilità dei criteri utilizzati nei vari studi. Attualmente non ci sono criteri standardizzati di laboratorio[2].

Classicamente, l'anemia da flogosi cronica è stata definita da Cartwright come un'anemia associata a bassa sideremia, ridotti sideroblasti midollari e aumentato ferro a livello reticoloendoteliale, il tutto in un contesto sistemico di infiammazione[33].

Tuttavia alcuni recenti studi epidemiologici hanno modificato tali criteri includendo nelle anemie da flogosi cronica qualsiasi caso in cui la sideremia sia minore di 60mg/dL, la ferritina sierica normale o elevata e ci sia assenza di altre cause[34].

La questione è ancora più complicata dal fatto che nell'invecchiamento fisiologico i marker di infiammazione sono aumentati[2].

2.2.4 Anemia da malattia renale

È stato dimostrato che la riduzione della funzionalità renale si associa a livelli più bassi di eritropoietina, ma il grado di riduzione di funzionalità renale che porta ad anemia è tuttora controverso. Soltanto una VFG minore di 30ml/min/1.73m^2 è stata associata ad anemia nell'anziano[2].

Nonostante il fatto che il principale meccanismo patogenetico dell'anemia da malattia renale sia la riduzione della produzione di eritropoietina, l'infiammazione potrebbe essere un importante fattore che contribuisce allo sviluppo di anemia in questi pazienti[2].

2.2.5 Mielodisplasia (MDS) e neoplasie ematologiche

La mielodisplasia e le neoplasie ematologiche non erano comprese nella classificazione eziologica dello studio NHANES III. Tuttavia si pensa che alcune delle anemie su causa indeterminata possano essere attribuite a sindromi mielodisplastiche[35].

La diagnosi di MDS può essere difficoltosa qualora i classici segni di citopenia, displasia e anomalie citogenetiche non siano presenti. Secondo gli studi di Artz e Thirman[36], e Price et al.[37], rispettivamente il 9 e il 16% tra gli anziani anemici avevano esami di sangue periferico e/o midollo che erano sospetti ma non diagnostici per MDS.

2.2.6 Anemia da cause sconosciute

In circa un terzo degli anziani anemici la causa è sconosciuta, il che rende impossibile instaurare un trattamento mirato[34].

Resta non chiaro se l'anemia da cause sconosciute sia una vera e propria diagnosi, oppure se comprenda multiple cause con coinvolgimento di più pathways. Talvolta è stata descritta come una diagnosi "cestino della spazzatura" , tuttavia vi sono evidenze che suggeriscono che potrebbe essere un'entità clinica ben definita, con una potenziale causa unificante[2].

Si tratta di un'anemia ipoproliferativa, con un midollo ipocellulare, bassi livelli di eritropoietina sierica per il grado di anemia, e marker infiammatori non elevati[36].

3. La vitamina B_{12} o cobalamina

3.1 Forme chimiche

La vitamina B_{12} è una vitamina idrosolubile che si può trovare in diverse forme, di cui le due forme metabolicamente attive sono la metilcobalamina e la deossiadenosilcobalamina[38], tutte caratterizzate da un atomo di cobalto al centro di un anello tetrapirrolico[39].

3.2 Fonti alimentari

La vitamina B_{12} si trova in alimenti di origine animale, come carne, pesce, uova e latticini[40]. Una dieta normale nei paesi occidentali apporta 5-30 microgrammi/die di cobalamina, più che sufficienti al fabbisogno giornaliero di vitamina B_{12}, che è di 1-3 μg/die[41].

3.3 Assorbimento, trasporto e deposito

Assorbimento

L'assorbimento di tale vitamina è un processo complesso che dipende dal normale funzionamento del tratto gastrointestinale (stomaco, pancreas, intestino tenue), che diventa meno efficiente con l'età[40]. Tale processo è mostrato nella fig.1.

La vitamina B_{12} è legata a proteine alimentari; questo legame viene scisso dall'acido cloridrico e dalla pepsina, permettendo il rilascio della vitamina[40]. Tuttavia la vitamina B_{12} in forma sintetica (cianocobalamina[38]), che si trova nei cibi

arricchiti e negli integratori, è già in forma libera perciò non è necessaria la presenza di acido cloridrico[40].

La vitamina B_{12} libera si lega quindi nello stomaco alla proteina R, che è secreta da stomaco e ghiandole salivari per proteggere la vitamina B_{12} dalla degradazione che altrimenti avverrebbe nell'ambiente acido dello stomaco[39].

Nel duodeno gli enzimi pancreatici scindono il legame vitamina B_{12} - proteina R, e la vitamina B_{12} si lega al fattore intrinseco[42]. Il fattore intrinseco, prodotto dalle cellule parietali gastriche, non può legare la vitamina B_{12} nell'ambiente acido dello stomaco, ma può legarla nel pH alcalino dell'intestino[38].

Quando il complesso vitamina B_{12} -fattore intrinseco arriva all'ileo distale[43] lega i recettori (cubilina) e viene assorbito per fagocitosi[44]. La vitamina B_{12} entra quindi in circolo.

Tuttavia c'è un limite per quanto riguarda la quantità di vitamina B_{12} che può essere assorbita attraverso la via vitamina B_{12} -fattore intrinseco: i recettori vengono saturati con assunzioni di vitamina maggiori di 1.5-2.0 μg[45] per ogni pasto[39].

Quando vengono ingerite grandi quantità di vitamina B_{12}, essa può essere assorbita tramite una via alternativa, la diffusione passiva[46], che permette l'assorbimento intestinale[39] di circa l'1% della quantità di vitamina B_{12} ingerita, anche in assenza di fattore intrinseco[39].

Trasporto

Una volta assorbita, la vitamina B_{12} si lega a proteine di trasporto: transcobalamina I, II e III e aptocorrina. Legando la transcobalamina si forma la olotranscobalamina, la frazione metabolicamente attiva della vitamina[47].

La transcobalamina II, nonostante rappresenti solo una piccola percentuale delle transcobalamine (10%), è la più importante perché permette l'ingresso di cobalamina in tutte le cellule del corpo.

Nelle cellule si ha un'endocitosi del complesso transcobalamina II-cobalamina, e la cobalamina è liberata e convertita nelle sue due forme coenzimatiche: metilcobalamina e adenosilcobalamina[47].

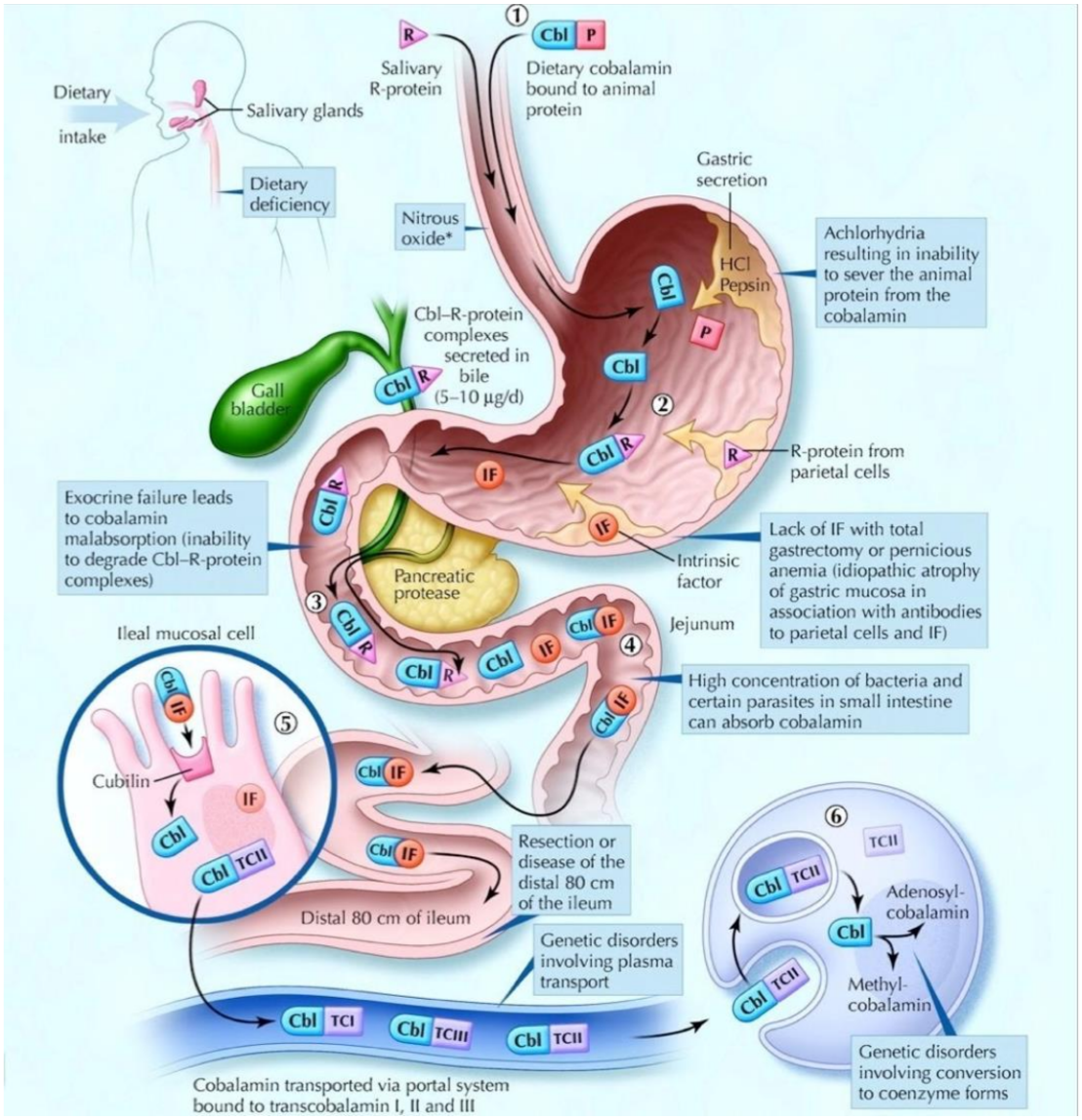


Figura 1: Metabolismo della vitamina B_{12} e corrispondenti cause di deficit

Deposito

I depositi di vitamina B_{12} possono raggiungere i 5mg, e si trovano per la maggior parte nel fegato[40]. Il fegato riversa circa 1-10 μg/die di vitamina B_{12} nella bile[48], tuttavia il 90% di questa è riassorbita (circolo enteroepatico), mentre la restante parte è escreta con le feci[40].

Il fabbisogno quotidiano di cobalamina è talmente basso rispetto ai depositi che sono necessari 5-10 anni per sviluppare un deficit di vitamina B_{12} [49].

3.4 Struttura e funzioni fisiologiche

La vitamina B_{12} è un cofattore per due enzimi, la metionina sintasi e la metilmalonilCoA mutasi:

- Il cofattore della metilmalonilCoA mutasi è l'adenosilcobalamina; questo enzima converte il metilmalonilCoA in succinilCoA, un metabolita del ciclo degli acidi tricarbossilici: è una reazione importante per il metabolismo degli aminoacidi a catena ramificata e di alcuni acidi grassi[40] (per l'estrazione di energia dalle proteine e dai grassi).
- Il cofattore della metionina sintasi è la metilcobalamina; la metionina sintasi catalizza la metilazione dell'omocisteina a metionina, il precursore dell'S-adenosilmetionina (fig.2). Quest'ultimo è un donatore universale di metili, fondamentale per la metilazione di fosfolipidi, neurotrasmettitori, amine, DNA, RNA e proteine mieliniche[40].

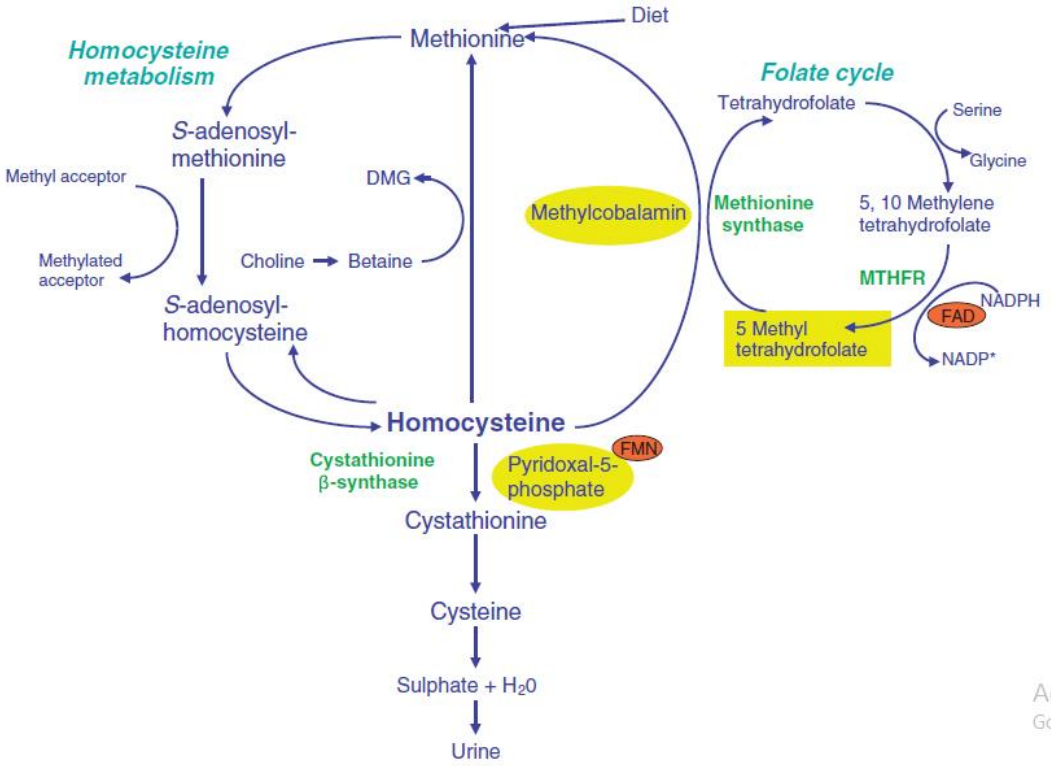


Figura 2: Metabolismo di vitamina B_{12} e folato

4. Il deficit di vitamina B_{12}

In caso di deficit della vitamina B_{12} si avrà ridotta attività dei due enzimi:

- La ridotta attività della metilmalonilCoA mutasi determina l'accumulo del suo substrato, il metilmalonilCoA, che va a formare l'acido metilmalonico (MMA); questo viene poi riversato in circolo[40].
- La ridotta attività della metionina sintasi determina la riduzione di importanti reazioni di metilazione come la sintesi del DNA[49] (purine e pirimidine[50]) e la mielinizzazione del SN[51], e elevate concentrazioni di omocisteina in circolo[40].

4.1 Correlazione tra deficit di vitamina B_{12} e folato

L'anemia megaloblastica che si ha nel paziente con deficit di vitamina B_{12}, caratterizzata da globuli rossi immaturi e di grandi dimensioni come risultato del deficit di sintesi del DNA, si ha anche nel paziente con deficit di folato perché queste due vitamine hanno in comune l'enzima metionina sintasi. Questo enzima infatti si trova sia nel ciclo di rimetilazione dell'omocisteina che nel ciclo del folato (vedi fig.2), nel quale converte il metil-tetraidrofolato in tetraidrofolato, che è la forma metabolicamente attiva[40].

Nel deficit di vitamina B_{12} l'attività della metionina sintasi è ridotta, per cui non si ha la formazione del tetraidrofolato: il folato resta intrappolato come metil-tetraidrofolato, che è una forma inutilizzabile[40]. Il 5-metil-tetraidrofolato deriva dal 5,10-metilenetetraidrofolato (tramite l'enzima metilenetetraidrofolato reduttasi, MTHFR), e tale riduzione è irreversibile: il 5-metil-tetraidrofolato non può essere ritrasformato in 5,10-metilenetetraidrofolato. Inoltre l'S-adenosilmetionina è un inibitore del MTHFR, perciò i bassi livelli di S-

adenosilmetionina che si hanno nel deficit di vitamina B_{12} riducono l'inibizione del MTHFR, determinando la riduzione del 5,10-metilenetetraidrofolato a 5-metil-tetraidrofolato, intrappolando ulterior-mente il folato in questa forma inutilizzabile. In questo caso si ha uno pseudo deficit di folato: il folato c'è, ma non è nella forma attiva che può essere usata dalle cellule[40].

4.2 Biomarkers per la diagnosi di deficit di vitamina B_{12}

4.2.1 Concentrazione di vitamina B_{12} totale nel siero

La misurazione della concentrazione di vitamina B_{12} totale nel siero è stato per tanti anni il test standard per la diagnosi di deficit di vitamina B_{12}. Il test microbiologico è il gold standard, tuttavia vi sono ora nuovi test che hanno dei vantaggi quali il minore impiego di tempo, la minore sensibilità ad antibiotici o chemioterapici, l'ampia disponibilità e i bassi costi[40].

Tuttavia alcuni studi hanno messo in evidenza che un basso livello sierico di vitamina B_{12} non equivale sempre ad un deficit di vitamina B_{12}, e al contrario un livello sierico normale di vitamina B_{12} non esclude un deficit di vitamina B_{12} [52].

Non ci sono dei livelli di cut-off standard: ogni laboratorio ha il proprio range di riferimento, che dipende dal tipo di test che utilizza. I cut-off più bassi citati in letteratura vanno da 110 a 260 pmol/L[53]. Il cut-off più frequentemente utilizzato è di 150 pmol/L[51].

La vitamina B_{12} totale nel siero non riflette i livelli di vitamina B_{12} intracellulare. Si possono avere livelli falsamente elevati in alcune condizioni quali disfunzioni epatiche, insufficienza renale o deficit di transcobalamina II[40]. Livelli falsamente bassi invece si possono avere in un deficit severo di ferro o di folati, nella gravidanza, nel mieloma multiplo e nell'HIV[54].

4.2.2 Concentrazione di omocisteina nel plasma

La rimetilazione dell'omocisteina a metionina è interrotta in caso di deficit di vitamina B_{12}, perciò le concentrazioni plasmatiche di omocisteina aumentano. Nonostante il fatto che l'omocisteina plasmatica sia molto sensibile al deficit di vitamina B_{12}, essa manca di specificità. Questo perché le concentrazioni plasmatiche di omocisteina sono determinate non solo dalla vitamina B_{12}, ma anche dal folato[55], dalla vitamina B6[56], dalla funzionalità renale, dall'età, dal sesso[57] e dai polimorfismi genetici[58].

I valori di riferimento variano da un laboratorio all'altro; una concentrazione di omocisteina tra 5 e 15 μmol/L è generalmente considerata normale[59].

4.2.3 Concentrazione di metilmalonato nel siero

Nel deficit di vitamina B_{12} l'attività dell'enzima metilmalonilCoA mutasi è ridotta, portando all'accumulo di metilmalonato, che si può trovare sia nel sangue che nelle urine[40].

Il metilmalonato plasmatico è quindi un marker specifico del livello di vitamina B_{12} ed è attualmente il miglior indicatore del deficit di vitamina B_{12} [60]. Più del 95% dei pazienti con deficit di vitamina B_{12} hanno livelli sierici di metilmalonato significativamente elevati[40].

Un valore sierico <0.30 μmol/L è indicativo di assenza di deficit.
Il metilmalonato sierico riflette la disponibilità di vitamina B_{12} intracellulare[40]. Tuttavia diventa elevato in soggetti con disfunzione renale e quindi potrebbe essere meno utlie nei soggetti anziani; ha inoltre costi elevati[61].

4.2.4 Concentrazione di olotranscobalamina nel siero

Il principale limite della vitamina B_{12} sierica è che essa misura la concentrazione totale della vitamina, mentre l'olotranscobalamina rappresenta la frazione attiva della vitamina[40] (è la vitamina B_{12} legata alla transcobalamina II[51]), perciò potrebbe essere un indice più affidabile.

Si pensa che una riduzione della olotranscobalamina possa essere il più precoce segno di deficit di vitamina B_{12} [41]. Si pensa inoltre che l'olotranscobalamina sia il marker migliore per il deficit di vitamina B_{12} nei soggetti anziani[62].

Livelli inferiori a 19-42 pmol/L (dipendentemente dal laboratorio) suggeriscono un deficit di vitamina B_{12} [47].

Tuttavia l'olotranscobalamina è influenzata da deficit di funzionalità renale, dal polimorfismo del gene della transcobalamina, da patologie epatiche e dagli ormoni sessuali femminili[63]. È inoltre costosa, il che limita il suo utilizzo nella pratica clinica.

5. Il deficit di vitamina B_{12} nel paziente anziano

Il deficit di vitamina B_{12} è frequente nell'anziano, e la frequenza può variare dal 5 al 40% in base al cutoff utilizzato[39]. Gli anziani istituzionalizzati con comorbidità multiple e dipendenza funzionale sono più soggetti a tale deficit rispetto agli anziani non istituzionalizzati[64].

Le cause possono essere molteplici (fig.3), la più frequente è il malassorbimento di vitamina B_{12} di origine alimentare; vi sono poi l'anemia perniciosa, l'insufficiente apporto con la dieta, i farmaci come gli inibitori di pompa protonica, la gastroresezione e le malattie intestinali[40].

Spesso il deficit di vitamina B_{12} è misconosciuto perché le manifestazioni cliniche sono lievi o assenti. Le manifestazioni cliniche possono anche essere gravi, in particolare quelle neuropsichiatriche e ematologiche[40].

5.1 Il deficit di vitamina B_{12} nell'anziano istituzionalizzato

Gli anziani istituzionalizzati con comorbidità multiple e dipendenza funzionale hanno un aumentato rischio di deficit di vitamina B_{12}, con una prevalenza che va dal 30 al 40%[39].

In uno studio condotto su 2000 anziani cinesi istituzionalizzati, la prevalenza del deficit di vitamina B_{12} (definita come livello di vitamina B_{12} nel siero <150pmol/L) è risultata essere del 34,9%. Tale prevalenza è più alta rispetto agli studi condotti su anziani freee living, nei quali la prevalenza è del 5-20%[39].

Gli anziani istituzionalizzati dipendono da altri per le loro attività quotidiane. Sono incoraggiati a bere latte o integratori, per cui dovrebbero avere una ridotta prevalenza di deficit di vitamina B_{12}. Tuttavia le comorbidità multiple e le malattie croniche sono dannose per lo stato nutrizionale dell'individuo, e potrebbero

aumentare la richiesta di vitamina B_{12}. La mancanza di fame e la disfagia, con conseguente scarso apporto alimentare, possono ulteriormente compromettere lo stato vitaminico. L'utilizzo cronico di farmaci come inibitori di pompa protonica o metformina può inoltre interferire con l'assorbimento della vitamina B_{12} [39].

5.2 Cause di deficit di vitamina B_{12} nell'anziano

5.2.1 Inadeguato apporto con la dieta

L'inadeguato apporto con la dieta è molto raro nel paziente anziano, infatti la dieta degli anziani fornisce vitamina B_{12} in eccesso rispetto al fabbisogno. Nei paesi sviluppati apporti alimentari inadeguati di vitamina B_{12} sono estremamente rari, ad eccezione dei soggetti vegetariani e vegani[40].

5.2.2 Malassorbimento

5.2.2.1 Anemia perniciosa

Rappresenta l'1-2% delle cause di deficit di vitamina B_{12} nell'anziano[65]. È una malattia autoimmune caratterizzata dalla distruzione della mucosa gastrica e perdita del fattore intrinseco[40], e gli autoanticorpi chiamati in causa sono: gli anticorpi anti-cellule parietali gastriche e gli anticorpi anti-fattore intrinseco[49]. La perdita del fattore intrinseco impedisce non solo l'assorbimento della vitamina B_{12} di origine alimentare, ma anche il riassorbimento della vitamina B_{12} presente nella bile (circolo enteroepatico). Questo determina un progressivo e permanente depauperamento dei depositi di vitamina B_{12} [66].

I pazienti con anemia perniciosa inoltre, a causa dell'ipoproduzione di acido cloridrico, avranno una ipergastrinemia con iperplasia delle cellule G localizzate

nell'antro gastrico. L'ipergastrinemia è suggestiva ma non patognomonica di anemia perniciosa[67].

Nonostante potrebbe richiedere molti anni per dare manifestazioni cliniche, l'anemia perniciosa può condurre a morte se non trattata[68].

I pazienti devono essere trattati con iniezioni intramuscolari di vitamina B_{12} per tutta la vita. Tuttavia alcune evidenze suggeriscono che la somministrazione orale di vitamina B_{12} ad alte dosipuò essere altrettanto efficace[69].

5.2.2.2 Malassorbimento di vitamina B_{12} di origine alimentare

È il più frequente negli anziani, ed è causato principalmente dalla gastrite atrofica, una patologia legata all'età che colpisce più del 30% dei soggetti di età >60 anni[70].
La gastrite atrofica è un'infiammazione cronica dello stomaco che porta progressivamente all'atrofia della mucosa, con conseguente riduzione della secrezione acida gastrica[40].

L'acido cloridrico è essenziale per il rilascio di vitamina B_{12} dalle proteine alimentari: la riduzione di acido impedisce l'assorbimento della vitamina B_{12}[65]. Inoltre la riduzione di acido promuove la sovracrescita batterica nello stomaco e nel piccolo intestino, e tali batteri utilizzano la vitamina B_{12}, riducendo ulteriormente la quantità di vitamina B_{12} disponibile per l'assorbimento[39]. L'infezione da Helicobacter Pylori è stata associata allo sviluppo della gastrite atrofica e al deficit di vitamina B_{12}[71].

Il malassorbimento di vitamina B_{12} di origine alimentare determina un deficit di vitamina B_{12} più lieve, e resta non chiaro se questo progredirà in un deficit clinicamente manifesto[68].

5.2.2.3 Malassorbimento di vitamina B_{12} causato da inibitori di pompa protonica

Gli inibitori di pompa protonica sono farmaci che inibiscono la produzione di acido e sono utilizzati per trattare patologie quali il reflusso gastroesofageo, condizioni associate all'uso di FANS, esofago di Barrett[40].

La terapia con inibitori di pompa protonica induce una condizione identica alla gastrite atrofica: l'utilizzo a lungo termine di tali farmaci può portare a deficit di vitamina B_{12}, soprattutto negli anziani[72]. Perciò l'inizio di una terapia con inibitori di pompa protonica deve essere associato a terapia con vitamina B_{12}[73].

5.2.2.4 Resezione gastrica o intestinale e malattie intestinali

L'assorbimento della vitamina B_{12} dipende dalla normale sturttura e dal normale funzionamento del tratto gastrointestinale, e questo funzionamento si riduce con l'età[40].

La gastroresezione distrugge le cellule principali e parietali dello stomaco, per cui la secrezione di acido, pepsina e fattore intrinseco sarà ridotta, e con essi anche l'assorbimento della vitamina B_{12} [74].

La resezione ileale invece ha come conseguenza la perdita dei recettori per il complesso vitamina B_{12} -fattore intrinseco, che sono importanti per l'assorbimento della vitamina B_{12} [40].

Molte malattie intestinali come il Chron, la celiachia e la diverticolite sono associate a deficit di vitamina B_{12} [40].

5.2.3 Polimorfismi genetici

Sono stati identificati molti polimorfismi di geni coinvolti nel metabolismo della vitamina B_{12}.

Il polimorfismo più importante è quello del gene che codifica per il MTHFR: soggetti omozigoti hanno una riduzione del metabolismo del folato, bassi livelli di folato sierico e intraeritrocitario, e elevate concentrazioni plasmatiche di omocisteina[40].
Vi sono poi polimorfismi della transcobalamina, che riducono l'affinità di legame e il trasporto della vitamina B_{12} [75].

5.2.4 Altre cause

Assunzione cronica di metformina (riduce la disponibilità intestinale di ioni calcio liberi, importanti per l'uptake del complesso vitamina B_{12}-fattore intrinseco dai recettori delle cellule ileali), antagonisti dei recettori H_2 dell'istamina (bloccano la produzione di acido cloridrico), alcoolismo cronico, insufficienza del pancreas esocrino[39].

Cause
Severe malabsorption
Pernicious anemia (autoimmune gastritis)
Total or partial gastrectomy
Gastric bypass or other bariatric surgery
Ileal resection or organ reconstructive surgery (ileal conduit diversion and ileocystoplasty)
Inflammatory bowel disease, tropical sprue
Imerslund–Gräsbeck and other syndromes‡
Mild malabsorption
Protein-bound vitamin B_{12} malabsorption
Mild atrophic gastritis
Use of metformin[14]
Use of drugs that block stomach acid
Dietary deficiency
Adults
Vegan or vegetarian diet, or diet low in meat and dairy products
Infants
Breast-feeding in infants with vitamin B_{12}–deficient mothers[15,16]

Fig. 3: Cause di deficit di vitamina B_{12}

5.3 Manifestazioni cliniche del deficit di vitamina B_{12}

Le manifestazioni cliniche si hanno generalmente nel deficit di vitamina B_{12} in stadio avanzato, tipico dell'anemia perniciosa[40], e sono dovute al fatto che il deficit di vitamina B_{12} ha effetto sulle cellule a rapido turnover e rapido metabolismo, come quelle del midollo osseo, del sistema nervoso e del tratto gastrointestinale[39].

5.3.1 Manifestazioni ematologiche

Anemia megaloblastica, causata dalla riduzione della sintesi del DNA nelle cellule del midollo a rapida proliferazione, e caratterizzata da: globuli rossi immaturi e di grandi dimensioni con basse concentrazioni di emoglobina; neutrofili ipersegmentati; leucopenia e trombocitopenia[40], dovute al fatto che sono colpite tutte le cellule a rapida divisione del midollo osseo[39].

Sintomi associati all'anemia megaloblastica sono pallore cutaneo, debolezza muscolare, facile affaticabilità e fiato corto, palpitazioni[39].

5.3.2 Manifestazioni neurologiche

Degenerazione combinata subacuta del midollo spinale (con deficit sensitivi e motori: debolezza, formicolio e intorpidimento delle mani e dei piedi[49]), neuropatia periferica (soprattutto sensitiva nelle estremità distali, con parestesia e torpore[39]), atassia, Babinski positivo, sintomi cerebrali tra cui atrofia ottica e incontinenza fecale[49].

Ci potrebbe anche essere deterioramento cognitivo, che può andare dalla perdita di concentrazione alla perdita di memoria, disorientamento fino ad arrivare alla demenza[39] (vedi paragrafo 5.4: "Vitamina B12 e patologie correlate all'età").

Le manifestazioni neurologiche progrediscono gradualmente[38], e la loro reversibilità dipende dal lasso di tempo che intercorre tra l'insorgenza e il trattamento[39]: se il trattamento è tardivo esse sono irreversibili (e peggiorate dalla somministrazione di folato)[76].

5.3.3 Manifestazioni digestive

Glossite di Hunter: atrofia delle papille linguali, che rendono la lingua liscia, lucida e arrossata; chelite angolare[49]; aumento di LDH e bilirubina per emolisi midollare; ulcere mucocutanee.

Type	Clinical manifestations
Haematological	Macrocytosis (frequent)
	Isolated thrombocytopenia and neutropenia, pancytopenia (rare)
Neuropsychiatric	Combined degeneration of the cord (classic)
	Peripheral neuropathy (frequency)
	Ataxia
	Optic atrophy (rare)
	Dementia
	Psychosis, depression
Digestive	Hunter's glossitis, angular stomatitis, jaundice, lactate and bilirubin elevation (classic)
Hyperhomocysteinaemia	Cardiovascular and thromboembolic risk

Figura 4: manifestazioni cliniche ematologiche, neuropsichiatriche e digestive nel deficit di vitamina B_{12}.

System	Manifestation	Comment
Hematological	Macrocytosis; hypersegmentation of the neutrophils; aregenerative macrocytary anemia; medullary megaloblastosis ("blue spinal cord")	Frequent
	Isolated thrombocytopenia and neutropenia; pancytopenia	Rare
	Hemolytic anemia; thrombotic microangiopathy (presence of schistocytes)	Very rare
Neuropsychiatric	Combined sclerosis of the spinal cord	Classic
	Polyneurites (especially sensitive ones); ataxia; Babinski's phenomenon	Frequent
	Cerebellar syndromes affecting the cranial nerves, including optic neuritis, optic atrophy, urinary or fecal incontinence	Rare
	Changes in the higher functions, even dementia, stroke and atherosclerosis (hyperhomocysteinemia); Parkinsonian syndromes; depression	Under study
Digestive	Hunter's glossitis; jaundice; lactate dehydrogenase and bilirubin elevation ("intramedullary destruction")	Classic
	Resistant and recurring mucocutaneous ulcers	Rare
	Abdominal pain; dyspepsia; nausea; vomiting; diarrhea; disturbances in intestinal functioning	Debatable
Gynecological	Atrophy of the vaginal mucosa and chronic vaginal and urinary infections (especially mycosis); hypofertility and repeated miscarriages	Under study
Other	Venous thromboembolic disease; angina (hyperhomocysteinemia)	Under study

Figura 5: Manifestazioni cliniche più frequenti e più rare nel deficit di vitamina B_{12}.

5.4 Vitamina B_{12} e patologie correlate all'età

Nuove evidenze correlano bassi livelli di vitamina B_{12} ad un aumentato rischio di patologie correlate all'età tra cui malattie cardiovascolari, deterioramento cognitivo e osteoporosi[40].

5.4.1 Rischio cardiovascolare

È stato dimostrato che l'abbassamento dei livelli plasmatici di omocisteina riduce il rischio di infarto[77]. Inoltre soggetti con livelli normali di vitamina B_{12} hanno un ridotto rischio di eventi vascolari ricorrenti[78].

5.4.2 Deterioramento cognitivo

Da studi caso-controllo si è osservato che i pazienti con Alzheimer avevano livelli di omocisteina significativamente più elevati rispetto ai controlli, perciò si pensa che il livello di vitamina B_{12} potrebbe essere un importante fattore di rischio modificabile per il deterioramento cognitivo senile[79]. Si stima che una riduzione di 3 μmol/L dei livelli di omocisteina ridurrebbe il rischio di demenza di più del 22%[80].

In uno studio è stato dimostrato che la supplementazione di vitamina B_{12} in pazienti con deterioramento cognitivo lieve rallentava l'atrofia cerebrale (valutata tramite immagini di RM[81]) e migliorava la performance cognitiva[82].

5.4.3 Osteoporosi

Alcuni studi hanno evidenziato che livelli plasmatici elevati di omocisteina e/o bassi livelli di vitamina B_{12} correlano con una bassa densità minerale ossea (BMD)[82], e con un maggior rischio di osteoporosi[83] e fratture[84].

Inoltre è stato dimostrato che in un paziente con anemia perniciosa, osteoporosi e fratture multiple, dopo 2 anni di terapia con vitamina B_{12} si ha un aumento della densità minerale ossea e riduzione dell'osteoporosi[85].

Tuttavia molti studi effettuati per valutare gli efetti della supplementazione di vitamina B_{12} non hanno mostrato effetti benefici. Sono quindi necessari ulteriori studi prma che si possa giungere ad una conclusione certa[40].

5.5 Deficit subclinico di vitamina B_{12}

Il deficit subclinico di vitamina B_{12}, ovvero senza manifestazioni cliniche, è molto più comune[42] e nella maggior parte dei casi è causato dal malassorbimento di vitamina B_{12} di origine alimentare[65].

5.6 Diagnosi del deficit di vitamina B_{12}

La diagnosi di **anemia perniciosa** si basa sulle manifestazioni cliniche (ematologiche, neurologiche e digestive) e sui livelli molto bassi di vitamina B_{12}[40]. Si possono inoltre cercare gli anticorpi anti-cellule parietali e anti-fattore intrinseco[86].

La diagnosi è invece più difficile nel caso di **deficit subclinico** e si basa sui biomarkers, in particolare è importante utilizzare in combinazione markers diretti

(vitamina B_{12} totale sierica o olotranscobalamina) e indiretti (omocisteina plasmatica e metilmalonato sierico)[68].

Nella gastrite cronica atrofica si avranno elevati livelli di gastrina[87].

5.6.1 Screening per il deficit di vitamina B_{12}

Lo screening attraverso misurazione dei livelli ematici di vitamina B_{12} dovrebbe essere fatto a tutti i soggetti di età >65 che siano malnutriti, in case di riposo o in ospedali psichiatrici, e a tutti i soggetti con manifestazioni ematologiche o neuropsichiatriche di deficit di vitamina B_{12}[49].

Ad oggi non c'è indicazione ad uno screening di massa negli anziani, anche a causa della mancanza di un gold standard per la diagnosi[51].

5.7 Trattamento del deficit di vitamina B_{12}

I pazienti con **anemia perniciosa** devono essere trattati con iniezioni intramuscolari di vitamina B_{12} per tutta la vita[40].

Alcune evidenze suggeriscono che la somministrazione orale di vitamina B_{12} ad alte dosi (1mg/die) può essere altrettanto efficace perché assorbita per diffusione passiva[88].

La vitamina B_{12} non ha effetti collaterali neanche quando somministrata ad alte dosi[89]. Tuttavia l'ipokaliemia, che deriva dall'uptake del potassio circolante da parte delle nuove cellule ematopoietiche in crescita e divisione, può essere severa. Perciò all'inizio della somministrazione di vitamina B_{12} si può fare una terapia temporanea con potassio per prevenire l'ipokalemia[51].

Per quanto riguarda il trattamento delle **forme subcliniche** non c'è accordo. In USA, ma non in Europa, si consiglia ai soggetti di età > 50 anni di assumere cibi arricchiti in vitamina B_{12} o integratori, che sono più che sufficienti per risolvere il malassorbimento di vitamina B_{12} di origine alimentare[90].

Nel caso di deficit di vitamina B_{12} dovuto ad una patologia sottostante trattabile come la sovracrescita batterica, patologie dell'ileo terminale[39], infezione da Helicobacter Pylori o insufficienza del pancreas esocrino, bisogna trattare tali patologie[51].

È anche importante sospendere o sostituire farmaci che possono portare al deficit di vitamina B_{12} come gli inibitori di pompa protonica[51].

6. L'acido folico

6.1 Fonti alimentari

L'acido folico o vitamina B_9 è una vitamina idrosolubile che si trova in alimenti quali frutta e verdura fresca, fegato[91] (fig. 6).

Common Foods Rich in Folic Acid
Green leafy vegetables*
Asparagus
Broccoli
Endive
Spinach
Lettuce
Lima beans
Fruit
Lemons
Bananas
Melons
Other
Liver
Kidney
Yeast
Mushrooms

Figura 6: Cibi ricchi di acido folico

Il contenuto di folato di una dieta media è di 250 μg/die, ma la quantità varia a seconda del tipo di alimenti assunti e della modalità di cottura: il folato è infatti degradato dal calore, soprattutto se cotto in abbondante acqua.
La quantità totale di folato nell'organismo è di circa 10 mg, di cui la maggior parte è contenuta nel fegato[9].

Il fabbisogno giornaliero è di circa 100 μg, e in condizioni normali i depositi sono sufficienti solo per 3 o 4 mesi[9].

6.2 Assorbimento, trasporto e escrezione

Il folato è rapidamente assorbito nella prima porzione dell'intestino tenue in misura pari a circa il 50% dell'acido folico alimentare.

Le molecole di poliglutammati vengono idrolizzate a derivati monoglutammati sia nel lume intestinale sia all'interno della mucosa[92].

Tutti i folati assunti con la dieta sono convertiti a 5-metil-tetraidrofolato (5-MTHF) all'interno della mucosa intestinale, prima di entrare nel circolo portale[9].

I monoglutammati sono attivamente trasportati attraverso gli enterociti con un meccanismo mediato da un trasportatore[93].

Ogni giorno circa 60-90 μg di folato entrano nella bile e sono escreti nell'intestino tenue. La perdita di questa quota di folato, insieme a quella delle cellule intestinali che si sfaldano, aumenta la rapidità con cui si instaura un deficit in condizioni di malassorbimento[9].

L'acido folico ed i suoi derivati sono escreti principalmente dal rene[92].

6.3 Funzioni fisiologiche

I folati agiscono da coenzimi nel trasferimento di una singola unità di carbonio. Due di queste reazioni intervengono nella sintesi delle purine e una in quella delle pirimidine, necessarie per la replicazione di DNA e RNA[9].

Il folato agisce inoltre da coenzima per la sintesi della metionina, processo in cui interviene anche la metilcobalamina, con rigenerazione del THF (vedi fig.2). La metionina è il precursore della S-adenosilmetionina, donatore universale di gruppi metilici[9].

Gli enzimi coinvolti nel pathway del folato sono[92]:

- diidrofolato reduttasi, l'enzima chiave del metabolismo di singole unità di carbonio;
- serina transidrossimetilasi, che converte la serina a glicina;
- THF metiltransferasi, che catalizza la metilazione dell'omocisteina a metionina;
- Timidilato sintetasi, che permette la formazione del dTMP dal dUMP e quindi la sintesi del DNA.

7. Il deficit di acido folico

L'acido folico è importante per il funzionamento del sistema nervoso a tutte le età[94].

Nel feto di una madre con deficit di acido folico si ha il rischio di difetti del tubo neurale. Il trattamento preventivo della madre con acido folico riduce significativamente tale rischio[95].

Nei neonati, bambini e adolescenti errori nel trasporto e metabolismo del folato sono associati a ritardo di sviluppo, deterioramento cognitivo, sintomi psichiatrici, epilessia e segni di demielinizzazione[96].

Nell'adulto circa i 2/3 dei pazienti con deficit di acido folico ha sintomi neuropsichiatrici[96].

7.1 Folato-cobalamina e omocisteina

Le concentrazioni plasmatiche di folato e cobalamina non riflettono correttamente la disponibilità nei tessuti[97].

L'omocisteina plasmatica invece riflette l'interazione intracellulare del metabolismo di folato e cobalamina nel ciclo della metilazione[98]. È il marker più sensibile e rapido del deficit di folato e cobalamina[99]. È stato calcolato che il 75% degli alti livelli di omocisteina sono attribuibili al deficit vitaminico.

Tuttavia l'eliminazione dell'omocisteina dipende dalla funzionalità renale, per cui l'insufficienza renale può causare un'elevazione dell'omocisteina. I livelli di omocisteina si modificano inoltre quando i meccanismi di trasporto della vitamina nelle cellule sono alterati e quando mancano gli enzimi[91].

8. Il deficit di acido folico nell'anziano

Le cause più frequenti di deficit di acido folico nell'anziano solo i deficit nutritivi, il riscaldamento prolungato dei cibi, il malassorbimento, i deficit di enzimi del metabolismo del folato, le malattie del piccolo intestino e l'alcoolismo cronico.

Le principali manifestazioni cliniche sono quelle ematologiche e neuro-psichiatriche. Si ha inoltre un aumentato rischio cardiovascolare (infarto e stenosi carotidea) e un aumentato rischio di neoplasie (cancro colorettale).

8.1 Cause di deficit di acido folico nell'anziano

Il deficit di folato può essere dovuto a varie cause (fig.7). Un'importante causa nell'anziano sono sicuramente i deficit nutritivi[100]. Questi sono dovuti alla mancanza di denti o a dentiere non adeguate che riducono la masticazione, all'isolamento, a stati confusionali e all'assunzione di alcuni farmaci.

Il riscaldamento prolungato dei cibi riduce inoltre la quantità di folato alimentare[101].

Un'altra causa frequente nell'anziano è il malassorbimento, ad esempio nel caso dell'acloridria (es. assunzione di inibitori di pompa protonica)[102].

Altre cause possono essere malattie del piccolo intestino[103], deficit di enzimi del metabolismo del folato[104], alcoolismo cronico (che determina deficit nutritivi, ridotto assorbimento e metabolismo[105]).

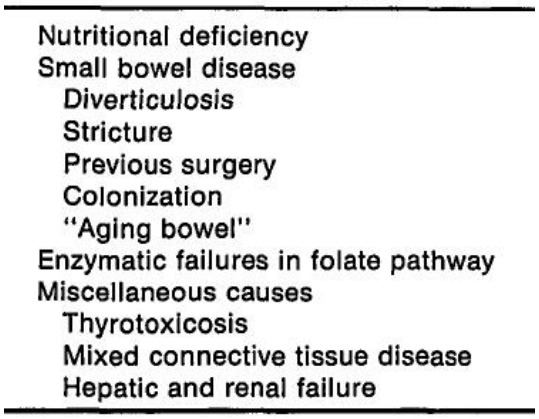


Figura 7: Cause di deficit di acido folico nell'anziano

8.2 Manifestazioni cliniche del deficit di acido folico

8.2.1 Manifestazioni ematologiche

La principale manifestazione ematologiaca è, come nell'anemia da deficit di vitamina B_{12}, l'anemia megaloblastica, a volte assente negli anziani[91].

8.2.2 Sintomi neuropsichiatrici

I deficit di folato si associano a deterioramento cognitivo, demenza, confusione, psicosi e depressione. I livelli di folato correlano con la severità della patologia mentale[106].

Studi clinici hanno mostrato un aumento di deficit di folato negli anziani con sintomi psichiatrici[107], e potrebbe trattarsi di un deficit causato da scarso apporto alimentare, oppure potrebbe essere il deficit di folato ad aggravare la patologia psichiatrica[108]. Da altri studi è stato infatti evidenziato che il deficit di folato può indurre atrofia cerebrale[109].

Si sa inoltre che i pazienti depressi con deficit di folato hanno score di depressione più alti e una risposta minore al trattamento con antidepressivi[110].

Dopo la somministrazione di folati, nei pazienti con demenza si possono avere vari gradi di miglioramento[111]. Le differenze nel miglioramento potrbbero essere dovute alla severità della malattia e alla sua durata.

Da alcuni studi è emerso che, dopo aver trattato con folato anziani con bassi livelli di folato nel liquido cefalorachidiano, si aveva un aumento di folato nel liquido cefalorachidiano nei pazienti in cui la malattia neuropsichiatrica rispondeva al folato[112].

8.2.3 Sintomi neurologici

La sintomatologia è simile a quella del deficit di cobalamina: ridotta sensibilità vibratoria, parestesie, ipoestesie, anomalie nella deambulazione e vertigini[113].

8.2.4 Rischio cardiovascolare

Alcuni studi hanno mostrato una correlazione tra i bassi livelli di vitamina B_{12} e folato e il rischio cardiovascolare, in particolare infarto[114] e stenosi carotidea[115].

8.2.5 Tumori

È coinvolta la ridotta sintesi del DNA, che porta ad una ridotta capacità di riparazione[116] e di soppressione dell'iperproliferazione cellulare[117].

Mantenere livelli adeguati di folato può essere importante per ridurre il rischio di cancro colorettale[118].

8.3 Diagnosi del deficit di folato

All'anamnesi bisogna ottenere informazioni sull'apporto alimentare del paziente, i farmaci che assume e lo stile di vita[91].

Esami del sangue di folato, vitamina B_{12} e omocisteina sono obbligatori e dovrebbero essere integrati da emoglobina, creatinina, ferro, glucosio e funzionalità tiroidea[91].

I livelli di folato possono essere determinati sia nel siero che all'interno dei globuli rossi, quest'ultimo rappresenta in modo più accurato il folato tissutale. Possono essere determinati anche nel liquido cefalorachidiano e nelle urine[119].

In caso di anemia megaloblastica si avrà macrocitosi, neutrofili ipersegmentati e pancitopenia[92].

8.4 Trattamento del deficit di folato

I valori di riferimento del laboratorio sono soltanto dei cut-off che definiscono la normalità in una popolazione di riferimento in salute, pertanto valori al di sotto del cut-off non implicano il trattamento. È consigliabile trattare soprattutto i soggetti sintomatici[91].

Pazienti con deficit di folato e aumentata omocisteina plasmatica rispondono in modo diverso alla terapia.

Pazienti con sintomi neurologici potrebbero avere un miglioramento parziale o anche una regressione completa dei sintomi. I sintomi che restano dopo la terapia dipendono dalla severità della malattia e dalla durata della malattia[120]. Dopo la remissione dei sintomi post terapia, deve essere garantita una dose sufficiente di vitamina come mantenimento.

Mentre i disordini ematologici rispondono rapidamente alla terapia, i disordini neurologici rispondono più lentamente probabilmente per il rapido turnover delle cellule ematiche rispetto al lento turnover delle cellule del sistema nervoso[91].

PARTE SPERIMENTALE

1. Introduzione e scopo dello studio

Per quanto riguarda il **deficit di acido folico**, sappiamo dalla letteratura che le principali manifestazioni cliniche sono quelle ematologiche e neuro-psichiatriche. I deficit di folato si associano infatti a deterioramento cognitivo e demenza, e i livelli di folato correlano con la severità della patologia mentale. Studi clinici hanno mostrato un aumento di deficit di folato negli anziani con sintomi psichiatrici, e potrebbe trattarsi di un deficit causato da scarso apporto alimentare, oppure potrebbe essere il deficit di folato ad aggravare la patologia psichiatrica. Altri studi hanno poi mostrato una correlazione tra il deficit di folato e il rischio cardiovascolare (infarto e stenosi carotidea), e tra il deficit di folato e il rischio di neoplasie (cancro colorettale).

Dai dati della letteratura sappiamo che il **deficit di vitamina B_{12}** è frequente nell'anziano, e la frequenza può variare dal 5 al 40% in base al cutoff utilizzato. Spesso il deficit di vitamina B_{12} è misconosciuto perché le manifestazioni cliniche sono lievi o assenti. Tuttavia le manifestazioni cliniche possono anche essere gravi, in particolare quelle ematologiche e neurologiche (se il trattamento è tardivo, esse sono irreversibili). Nuove evidenze correlano i bassi livelli di vitamina B_{12} ad un aumentato rischio di patologie legate all'età tra cui le malattie cardiovascolari (infarto ed eventi vascolari ricorrenti) e il deterioramento cognitivo. Per quanto riguarda quest'ultimo, i livelli di vitamina B_{12} correlano con la severità della patologia mentale. Dopo la somministrazione di vitamina B_{12}, nei pazienti con demenza si possono avere vari gradi di miglioramento e le differenze nel miglioramento potrbbero essere dovute alla severità della malattia e alla sua durata. In uno studio è stato dimostrato che la supplementazione di vitamina B_{12}

in pazienti con deterioramento cognitivo lieve rallentava l'atrofia cerebrale e migliorava la performance cognitiva.

È quindi molto importante fare diagnosi di deficit di vitamina B_{12} e di acido folico nell'anziano.

L'obbiettivo del nostro studio è stato quello di valutare la prevalenza e l'associazione con l'outcome del deficit di acido folico e vitamina B_{12} in una popolazione di pazienti grandi anziani ricoverati presso un reparto internistico per patologie mediche acute.

2. Materiali e metodi

È stato condotto uno studio osservazionale retrospettivo riguardante la popolazione grande anziana afferente alla Clinica di Medicina Interna e Geriatria, INRCA di Ancona nel periodo compreso tra settembre 2018 e settembre 2020 per patologie mediche acute.

I dati dei pazienti di interesse per lo studio sono stati estratti dalle carte cliniche elettroniche del reparto ed inseriti in un apposito foglio di lavoro Excel.
I criteri di inclusione erano i seguenti: pazienti ospedalizzati per cause internistiche, età ≥80 anni, disponibilità degli esami ematochimici d'ingresso e dei dati di outcome.
In particolare sono stati considerati i seguenti parametri di ingresso: scompenso cardiaco, fibrillazione atriale, BPCO riacutizzata, polmonite, infezione delle vie urinarie (IVU), insufficienza renale acuta (IRA), insufficienza respiratoria, delirium, squilibri elettrolitici, anemia.
Al fine di valutare l'outcome sono stati presi in considerazione la mortalità intraospedaliera e la durata del ricovero.

2.1 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta mediante il software Statistical Package for Social Science versione 13 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) ed è stato scelto un livello di significatività (2-tailed) pari ad una $p<0,05$. Le variabili scalari sono state espresse come media ± deviazione Standard o come mediana e range interquartile per quelle non-gaussiane. Le variabili categoriche sono state espresse come percentuale o come prevalenza. È stato utilizzato il T-test per campioni indipendenti, il test di Wilcoxon per valutare le differenze tra le variabili scalari ed il test del chi quare per valutare le differenze tra variabili categoriche.

3. Risultati

Il numero di pazienti analizzati è 952, con un'età media di 87,8 ± 5,1 anni. Come si può osservare nell'areogramma sottostante (fig.1), la maggior parte della popolazione analizzata è di sesso femminile.

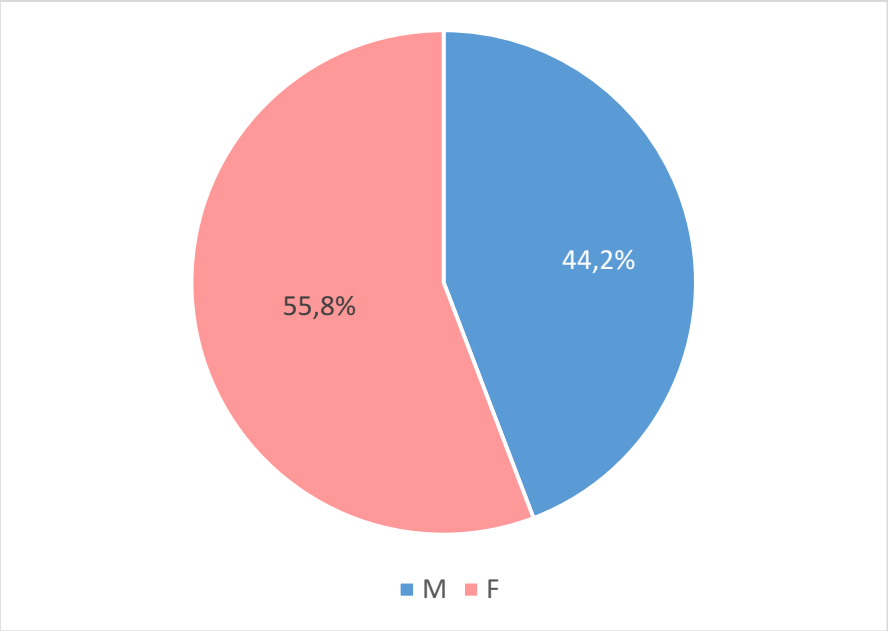


Figura 1: Percentuale dei due sessi

Nell'istogramma di fig.2 sono riportate le ***comorbidità*** dei pazienti all'anamnesi: il 70% avevanto ipertensione, il 47,9% demenza, il 36% fibrillazione atriale, il 30,6% scompenso cardiaco, il 30,3% BPCO, il 27,6% diabete mellito di tipo 2, il 24,6% stroke e il 23,2% cardiopatia ischemica.

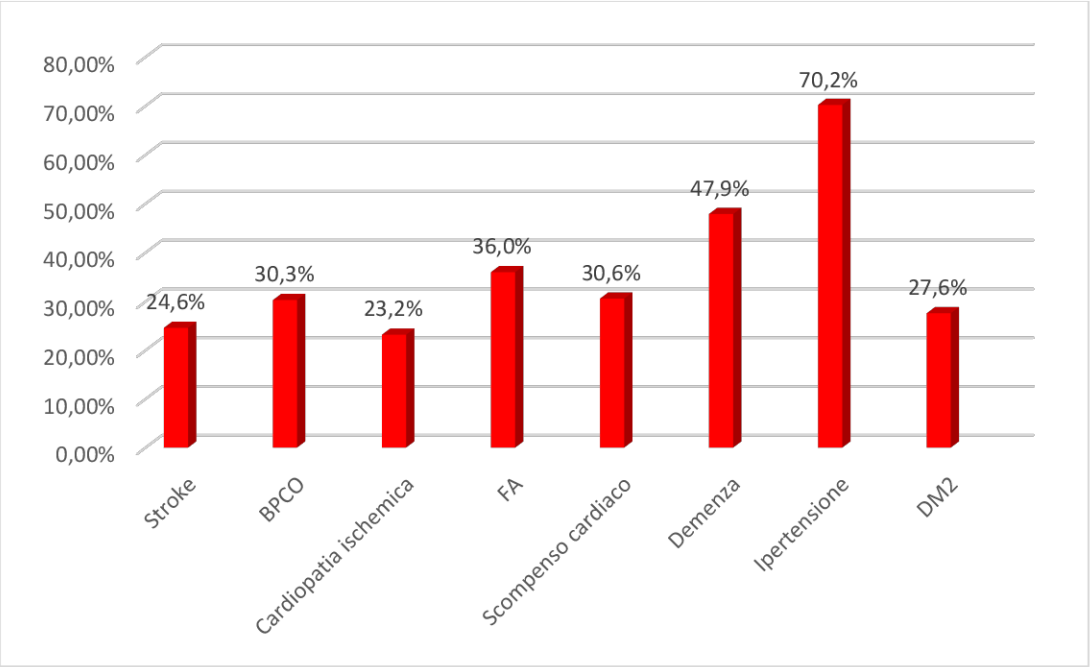


Figura 2: Comorbidità all'anamnesi

I ***valori pressori*** all'ingresso erano:

- pressione arteriosa sistolica (PAS): 125,5 ± 25,8 mmHg
- pressione arteriosa diastolica (PAD): 69,6 ± 13,3 mmHg

La ***frequenza cardiaca (FC)*** era di 82,8 ± 18,2 bpm.

I ***motivi di ricovero***, come mostrato in fig.3, erano:

- scompenso cardiaco: 41,2%
- fibrillazione atriale: 26,2%
- BPCO riacutizzata: 25,7%
- Polmonite: 24,1%
- Infezione delle vie urinarie (IVU): 11%
- Insufficienza renale acuta (IRA): 31,7%
- Insufficienza respiratoria: 29,7%

- Delirium: 6,5%
- Squilibri elettrolitici: 19,9%
- ANEMIA: 15,6%

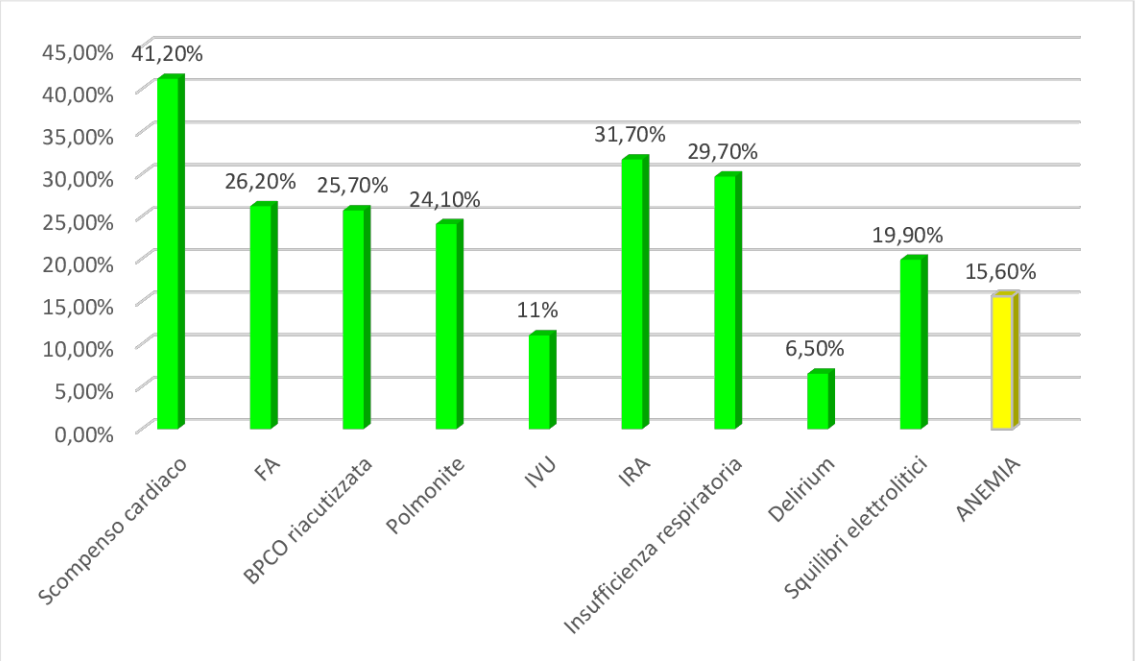


Figura 3: Motivi di ricovero

I pazienti che a casa facevano una ***polifarmacoterapia*** (> di 5 farmaci) erano il 73,8%.

Su un totale di 952 pazienti, il 60,3% aveva ***anemia***, come mostrato nell'areogramma sottostante (fig.4). L'anemia è stata definita da valori di emoglobina al di sotto di 12g/dL sia nel sesso maschile che in quello femminile.

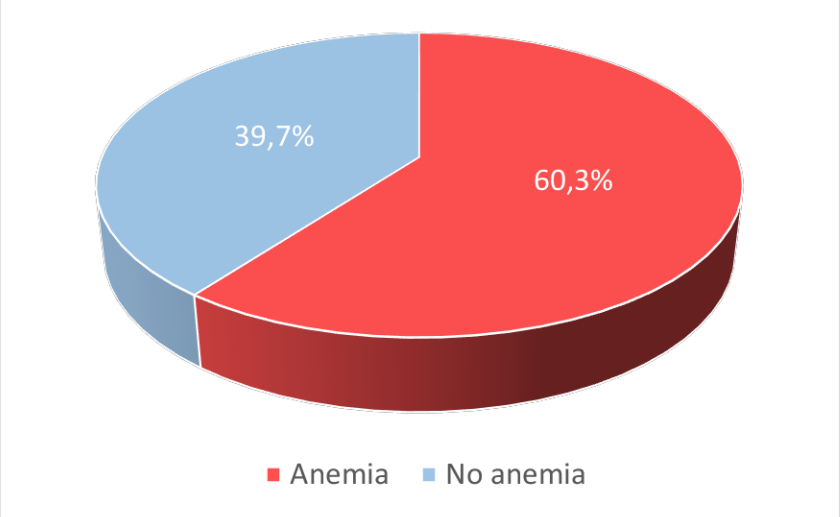


Figura 4: Pazienti con e senza anemia

Nella tabella 1 sono rappresentati gli ***esami ematochimici*** raggruppati in pazienti con e senza ***anemia***. Non c'era differenza di età media fra le due sottopopolazioni (87,8 ± 5,4 per i pazienti senza anemia vs 87,8 ± 4,9 per i pazienti con anemia, p=0.974).

	Totale	No anemia	Anemia	p
Emoglobina (g/dL)	11,3 ± 2,2	13,4 ± 1,3	10,0 ± 1,5	**<0,001**
MCV (fl)	88,9 ± 8,5	91,0 ± 5,6	87,4 ± 9,7	**0,023**
MCH (pg)	29,1 ± 3,1	30,2 ± 2,1	28,4 ± 3,5	**0,002**
Creatinina (mg/dL)	1,5 ± 1,1	1,3 (0,9-1,7)	1,5 (1,0-2,1)	**0,032**
eGFR (ml/min/1,73m2)	48,1 ± 24,5	51,4 ± 23,2	46,0 ± 25,2	**0,001**
Glicemia (mg/dL)	138,2 ± 73,6	137,5 (104,3-157,5)	115,0 (97,0-151,3)	**0,041**
Colesterolo totale (mg/dL)	141,4 ± 40,1	149,2 ± 39,9	136,2 ± 39,4	**<0,001**
HDL (mg/dL)	38,3 ± 17,1	41,0 ± 16,7	36,6 ± 17,2	**0,004**
Trigliceridi (mg/dL)	115,7 ± 59,7	113,5 (86,0-145,8)	93,5 (65,0-123,8)	**0,012**
Albumina (g/dL)	3,2 ± 0,6	3,4 ± 0,54	3,0 ± 0,6	**<0,001**
Acido folico (ng/mL)	7,2 ± 6,0	5,3 (3,5-9,1)	5,7 (3,8-11,1)	0,230
Vitamina B_{12} (ng/L)	699,8 ± 543,6	494,5 (401,4-729,9)	539,0 (360,3-1128,3)	0,792

Piastrine (n°/µL)	222500 (168000-289000)	245000 (204500-324250)	219000 (149500-276500)	0,851
LDH (U/l)	200 (160-264)	221,5 (172,25-330,0)	181,0 (153,3-256,5)	0,092
NT-proBNP (pg/mL)	2933,5 (1150,5-7625,8)	3069,0 (799,5-7359,3)	4687,0 (1189,3-9416,8)	**<0,001**
Reticolociti (n°/µL)	41000 (27000-57500)	39000 (21575-64750)	40000 (29250-57000)	0,981

Tabella 1: Esami ematochimici raggruppati in pazienti con e senza anemia

Nei pazienti con anemia i livelli di vitamina B_{12} e acido folico non sono risultati più bassi rispetto ai pazienti senza anemia.

Nei pazienti che presentavano anemia l'emoglobina era di 10,0 ± 1,5 mentre nei pazienti che non presentavano anemia l'emoglobina era di 13,4 ± 1,3 e questa differenza era statisticamente significativa (p<0,001).

Considerando invece l'MCV, questo era di 87,4 ± 9,7 fL nei pazienti con anemia, e di 91,0 ± 5,6 fL nei pazienti senza anemia, e questa differenza era statisticamente significativa (p=0,023).

Anche l'MCH era minore nei pazienti con anemia (28,4 ± 3,5 pg) rispetto a quelli con anemia (30,2 ± 2,1 pg), in modo significativo (p=0,002).

Per quanto riguarda la funzionalità renale, la creatinina era maggiore nei soggetti con anemia (1,5 mg/dL) rispetto ai soggetti senza anemia (1,3 mg/dL), e questa differenza era significativa (p=0,032). L'eGFR nei pazienti anemici era di 46,0 ± 25,2 ml/min/1,73m2, mentre nei pazienti non anemici era di 51,4 ± 23,2 ml/min/1,73m2, e questa differenza era significativa (p=0,001).

L'albumina era 3,0 ± 0,6 g/dL nei soggetti anemici e 3,4 ± 0,54 g/dL nei soggetti non anemici (p<0,001).

L'NT-proBNP era più elevato nei pazienti con anemia rispetto ai pazienti senza anemia (4687,0 vs 3069,0 pg/mL), p<0,001.

Le piastrine e l'LDH erano più bassi nei pazienti anemici, ma non in modo significativo (p=0,851 e 0,092 rispettivamente).

I reticolociti erano 40000 nei pazienti anemici e 39000 nei non anemici, ma questa differenza non era statisticamente significativa (p=0,981).

Andando a valutare la differenza di ***prevalenza di anemia nei maschi e nelle femmine***, abbiamo che chi aveva anemia tra i maschi era il 44,4%, invece chi non aveva anemia tra i maschi era il 43,9%, p=0,9, per cui non c'è differenza tra maschi e femmine.

Correlazione tra dati anamnestici e prevalenza di anemia

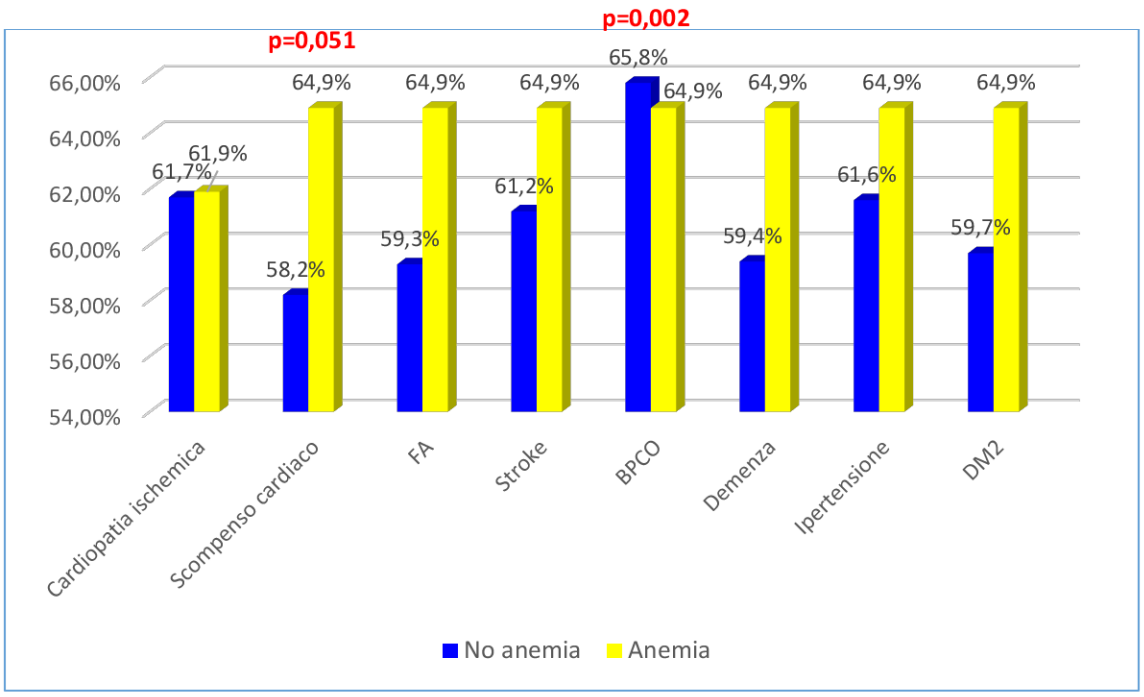


Figura 5: Correlazione tra comorbidità anamnestiche e prevalenza di anemia

Anamnesi per cardiopatia ischemica: l'anemia era presente nel 61,7% dei pazienti che non avevano avuto una cardiopatia ischemica, e nel 61,9% di coloro che

l'avevano avuta, per cui non c'è differenza tra chi ha avuto cardiopatia ischemica e chi non l'ha avuta. P=0,969.

Anamnesi per scompenso cardiaco: l'anemia era presente nel 58,2% dei pazienti che non avevano avuto scompenso cardiaco, e nel 64,9% dei pazienti che lo avevano avuto. P=0,051, i pazienti con scompenso cardiaco avevano maggior probabilità di avere anemia (64,9% vs 58,2%). Odds Ratio=1,3 : chi aveva scompenso cardiaco aveva una probabilità del 30% in più di avere anemia rispetto a chi non aveva lo scompenso cardiaco.

Anamnesi per fibrillazione atriale: l'anemia era presente nel 59,3% dei pazienti che non avevano avuto la fibrillazione atriale, e nel 66,2% dei pazienti che l'avevano avuta. P=0,08.

Anamnesi per stroke: l'anemia era presente nel 61,2% dei pazienti che non avevano avuto stroke, e nel 63,5% dei pazienti che l'avevano avuto. P=0,616.

Anamnesi per BPCO: l'anemia era presente nel 65,8% dei pazienti che non avevano avuto la BPCO, e nel 52,6% dei pazienti che l'avevano avuta. P=0,002. I pazienti con BPCO hanno quindi minore prevalenza di anemia rispetto a chi non ha la BPCO, in maniera significativa.

Anamnesi per demenza: l'anemia era presente nel 59,4% dei pazienti che non avevano demenza, e nel 64,4% dei pazienti che avevano demenza: l'anemia era leggermente maggiore in chi aveva la demenza, ma non in modo significativo, p=0,199.

Anamnesi per ipertensione: l'anemia era presente nel 61,6% dei pazienti che non avevano ipertensione e nel 59,7% dei pazienti che avevano ipertensione, p=0,586.

Anamnesi diabete mellito di tipo2: l'anemia era presente nel 59,7% dei pazienti che non avevano diabete, e nel 67,2% dei pazienti che lo avevano, p=0,08.

Prevalenza di deficit di vitamina B_{12} e acido folico

Su una popolazione totale di 952 pazienti, il deficit di acido folico è stato valutato in 245 pazienti, e si è visto che l'8,1% aveva deficit di acido folico.
Il deficit di vitamina B_{12} è stato invece valutato su 247 pazienti, e il 2,1% aveva deficit di vitamina B_{12}.
Il deficit sia di vitamina B_{12} che di acido folico era presente nello 0,8% dei pazienti.

Il deficit di acido folico era presente nel 34,8% dei pazienti senza anemia, e nel 30,7% dei pazienti con anemia. Per cui tra coloro che avevano anemia, il 30,7% aveva anemia da deficit di acido folico.
Il deficit di vitamina B_{12} era presente nell'8% dei soggetti con anemia: l'8% di chi aveva anemia aveva deficit di vitamina B_{12}.

Nella tabella 2 sono rappresentati gli ***esami ematochimici*** raggruppati in pazienti con e senza ***deficit di folato***. Non c'era differenza di età media fra le due sottopopolazioni (87,7 ± 4,6 per i pazienti senza deficit di folato vs 88,9 ± 5,5 per i pazienti con deficit di folato, p=0.071).

	Totale	**No deficit folato**	**Deficit folato**	**p**
Emoglobina (g/dL)	11,3 ± 2,2	10,2 ± 1,9	10,6 ± 2,0	0,205
MCV (fl)	88,9 ± 8,5	87,0 ± 11,9	90,7 ± 9,3	0,236
MCH (pg)	29,1 ± 3,1	28,0 ± 4,5	29,7 ± 3,2	0,135
Creatinina (mg/dL)	1,5 ± 1,1	1,4 (0,9-1,9)	1,25 (1,0-2,2)	0,796
eGFR (ml/min/1,73m2)	48,1 ± 24,5	47,5 ± 23,4	47,0 ± 25,2	0,892
Glicemia (mg/dL)	138,2 ± 73,6	115,0 (97,5-150,3)	123,0 (104,3-155,3)	0,937
Colesterolo totale (mg/dL)	141,4 ± 40,1	137,8 ± 37,8	144,0 ± 47,0	0,327
HDL (mg/dL)	38,3 ± 17,1	41,2 ± 16,6	35,6 ± 16,0	**0,030**
Trigliceridi (mg/dL)	115,7 ± 59,7	93,5 (65,0-117,3)	105,5 (84,8-217,5)	**0,008**

Albumina (g/dL)	3,2 ± 0,6	3,1 ± 0,6	3,1 ± 0,6	0,772
Acido folico (ng/mL)	7,2 ± 6,0	7,0 (5,0-12,0)	2,4 (2,0-3,1)	**<0,001**
Vitamina B_{12} (ng/L)	699,8 ± 543,6	535,5 (378,7-1101,3)	473,4 (266,3-907,3)	0,176
Piastrine (n°/µL)	222500 (168000-289000)	219000 (166000-280000)	235500 (139750-299500)	0,914
LDH (U/l)	200 (160-264)	187,5 (159,8-259,3)	174,0 (146,3-318,0)	0,370
NT-proBNP (pg/mL)	2933,5 (1150,5-7625,8)	4220,5 (1142,5-8509,5)	4252,0 (1771,0-10943,8)	0,862
Reticolociti (n°/µL)	41000 (27000-57500)	40500 (30000-56750)	39000 (15400-67750)	0,124

Tabella 2: Esami ematochimici raggruppati in pazienti con e senza deficit di folato

Chi aveva deficit di acido folico aveva reticolociti più bassi (p=0,124), folato più basso (p<0,001) e vitamina B_{12} più bassa (p=0,176).

Andando a valutare la differenza di ***prevalenza di deficit di acido folico nei maschi e nelle femmine***, abbiamo che chi aveva deficit di acido folico tra i maschi era il 49,4%, invece chi non aveva deficit di acido folico tra i maschi era il 43,5%, p=0,4, per cui non c'è differenza tra maschi e femmine.

Correlazione tra dati anamnestici e prevalenza di deficit di acido folico

In base all'anamnesi del paziente, non c'è maggiore prevalenza di deficit di acido folico in chi ha avuto cardiopatia ischemica, scompenso cardiaco, fibrillazione atriale, stroke, BPCO, demenza, ipertensione o diabete mellito di tipo2.

Nella tabella 3 sono rappresentati gli ***esami ematochimici*** raggruppati in pazienti con e senza ***deficit di vitamina B_{12}***. C'era differenza di età media fra le due sottopopolazioni (87,83 ± 5,0 per i pazienti senza deficit di vitamina B_{12} vs 90,7 ± 4,2 per i pazienti con deficit di vitamina B_{12}, p=0.013).

	Totale	No deficit vit. B_{12}	Deficit vit. B_{12}	p
Emoglobina (g/dL)	11,3 ± 2,2	10,37 ± 2,0	10,2 ± 2,0	0,758
MCV (fl)	88,9 ± 8,5	88,0 ± 10,5	105,9 ± 16,6	**0,023**
MCH (pg)	29,1 ± 3,1	28,5 ± 3,9	34,9 ± 6,0	**0,028**
Creatinina (mg/dL)	1,5 ± 1,1	1,3 (1,0-2,1)	1,0 (0,9-1,4)	0,146
eGFR (ml/min/1,73m2)	48,1 ± 24,5	46,87 ± 24,2	54,1 ± 22,3	0,198
Glicemia (mg/dL)	138,2 ± 73,6	120,0 (99,0-153,0)	105,0 (86,5-171,5)	0,892
Colesterolo totale (mg/dL)	141,4 ± 40,1	141,59 ± 41,6	124,1 ± 26,6	0,100
HDL (mg/dL)	38,3 ± 17,1	39,7 ± 16,8	37,8 ± 15,3	0,652
Trigliceridi (mg/dL)	115,7 ± 59,7	100,0 (69-127,0)	75,0 (56,5-93,0)	0,075
Albumina (g/dL)	3,2 ± 0,6	3,1 ± 0,6	3,1 ± 0,6	0,960
Acido folico (ng/mL)	7,2 ± 6,0	5,6 (3,8-11,0)	5,0 (1,5-16,0)	0,190
Vitamina B_{12} (ng/L)	699,8 ± 543,6	548 (381-1097,0)	152 (83,0-176,5)	**<0,001**
Piastrine (n°/µL)	222500 (168000-289000)	221000 (159000-286000)	269000 (179000-298500)	0,500
LDH (U/l)	200 (160-264)	187,0 (160,0-273,0)	133,0 (111,5-188,0)	0,148
NT-proBNP (pg/mL)	2933,5 (1150,5-7625,8)	4309,0 (1181,0-8850,0)	4179,0 (800,0-6525,0)	0,976
Reticolociti (n°/µL)	41000 (27000-57500)	40000 (27000-61000)	39000 (20000-47500)	0,426

Tabella 3: Esami ematochimici raggruppati in pazienti con e senza deficit di vitamina B_{12}

I livelli di emoglobina non erano molto diversi tra soggetti con deficit di vitamina B_{12} e soggetti senza tale deficit (10,2 ± 2,0 vs 10,37 ± 2,0 g/dL), p=0,758.
Nell'anemia da deficit di acido folico l'MCV non è maggiore, mentre nell'anemia da deficit di vitamina B_{12} l'MCV è maggiore (105,9 ± 16,6 vs 88,0 ± 10,5 fL), p=0,023.
Anche l'MCH è risultato aumentato nei soggetti con deficit di vitamina B_{12} rispetto ai soggetti senza tale deficit (34,9 ± 6,0 vs 28,5 ± 3,9 pg), in modo significativo (p=0,028).

Andando a valutare la differenza di ***prevalenza di deficit di vitamina B_{12} nei maschi e nelle femmine***, abbiamo che chi aveva deficit di vitamina B_{12} tra i maschi

era il 50,0 %, invece chi non aveva deficit di vitamina B_{12} tra i maschi era il 44,9%, p=0,7, per cui non c'è differenza tra maschi e femmine.

Correlazione tra dati anamnestici e prevalenza di deficit di vitamina B_{12}

In base all'anamnesi del paziente, non c'è maggiore prevalenza di deficit di acido folico in chi ha avuto cardiopatia ischemica, scompenso cardiaco, fibrillazione atriale, stroke, BPCO, ipertensione o diabete mellito di tipo2.

C'è invece una tendenza ad avere una maggiore prevalenza di deficit di acido folico nei pazienti con demenza, seppur non statisticamente significativa (65,0% vs 44,5%), p=0,08, odds ratio=2,3 , cioè c'è una probabilità 2,3 volte maggiore di avere demenza nei soggetti con deficit di vitamina B_{12} rispetto ai soggetti senza tale deficit.

Abbiamo inoltre studiato l'**outcome**, ovvero la prognosi, inteso sia come durata del ricovero ospedaliero sia come mortalità su tutta la popolazione analizzata.

La durata del ricovero era 11,9 ± 7,5 giorni, mentre la mortalità era del 17,9% su tutta la popolazione (952 pazienti), come mostrato in fig.6.

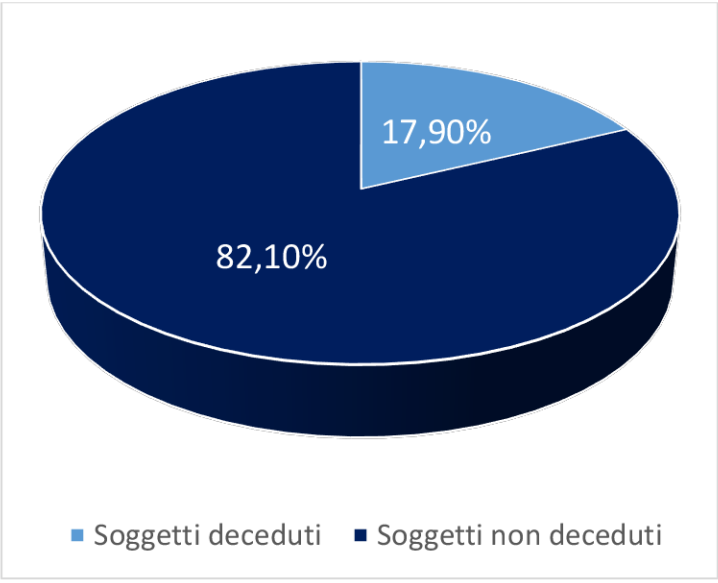


Figura 6: Mortalità su tutta la popolazione

Mortalità

Studiando l'associazione tra mortalità e **deficit di acido folico** è emerso che nei pazienti che avevano deficit di acido folico c'era una mortalità dell'11,7%, mentre nei pazienti senza tale deficit la mortalità era del 10,1% (fig.7), p=0,711, per cui non c'è differenza tra i 2 gruppi.

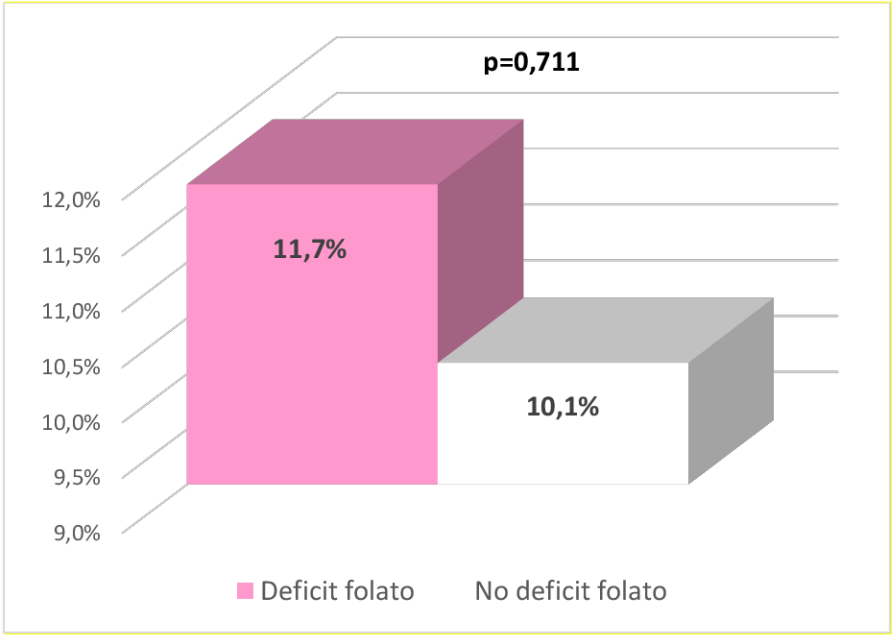


Fig 7: Mortalità nei pazienti con e senza deficit di folato

Studiando l'associazione tra mortalità e **deficit di vitamina B_{12}** è emerso che nei pazienti che avevano deficit di vitamina B_{12} c'era una mortalità del 15,0%, mentre nei pazienti senza tale deficit la mortalità era del 10,6% (fig.8), p=0,543.

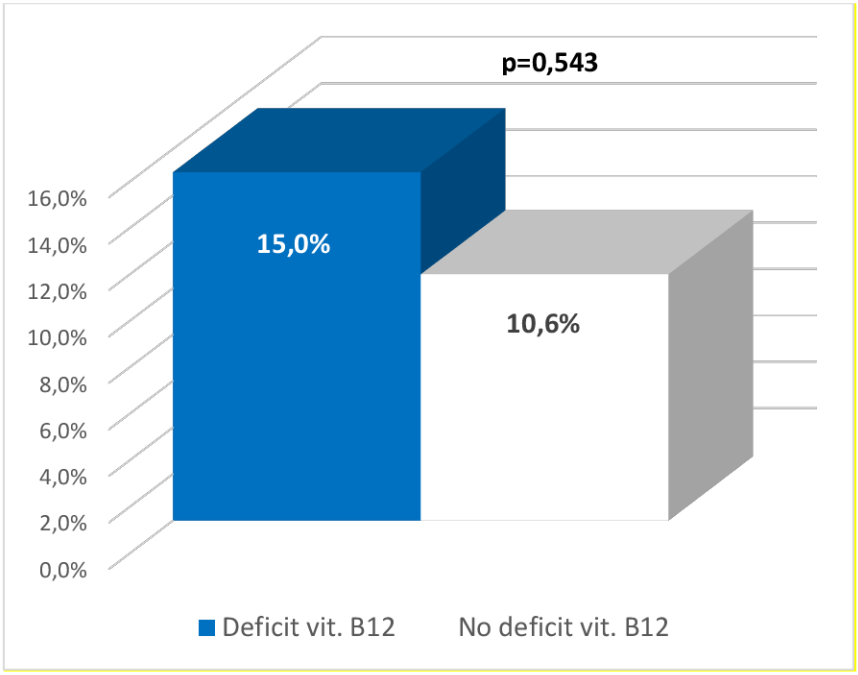


Fig 8: Mortalità nei pazienti con e senza deficit di vitamina B_{12}

Inoltre sia il deficit di **acido folico** che di **vitamina B_{12}** non risultavano associati a mortalità, neanche se prendevamo in considerazione i diversi **motivi di ingresso** dei pazienti in ospedale (cardiopatia ischemica, scompenso cardiaco, fibrillazione atriale, stroke, BPCO, demenza, ipertensione e diabete mellito di tipo2).

Abbiamo poi studiato una possibile associazione tra **anemia** e mortalità, ma è emerso che l'anemia in sé non è un fattore prognostico per mortalità, ma non è significativo (p=0,069).

Abbiamo inoltre valutato la differenza di livelli di **emoglobina, MCV e MCH** tra i soggetti deceduti e i soggetti non deceduti, come mostrato in fig.9 , e non è emersa nessuna differenza.

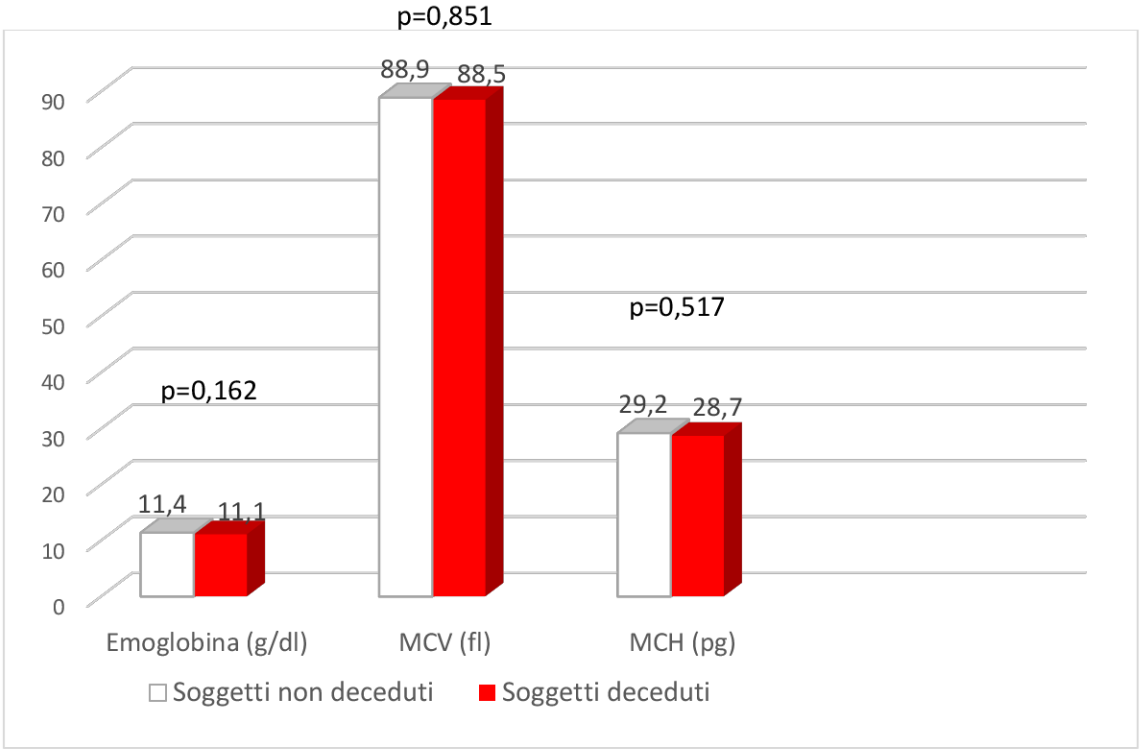


Figura 9: Emoglobina, MCV e MCH in soggetti deceduti e non deceduti

Durata del ricovero

Studiando la possibile associazione tra **anemia** e durata del ricovero è emerso che l'anemia in sé non è un fattore predittivo per la durata del ricovero (fig.10), ma non è significativo (p=0,954).

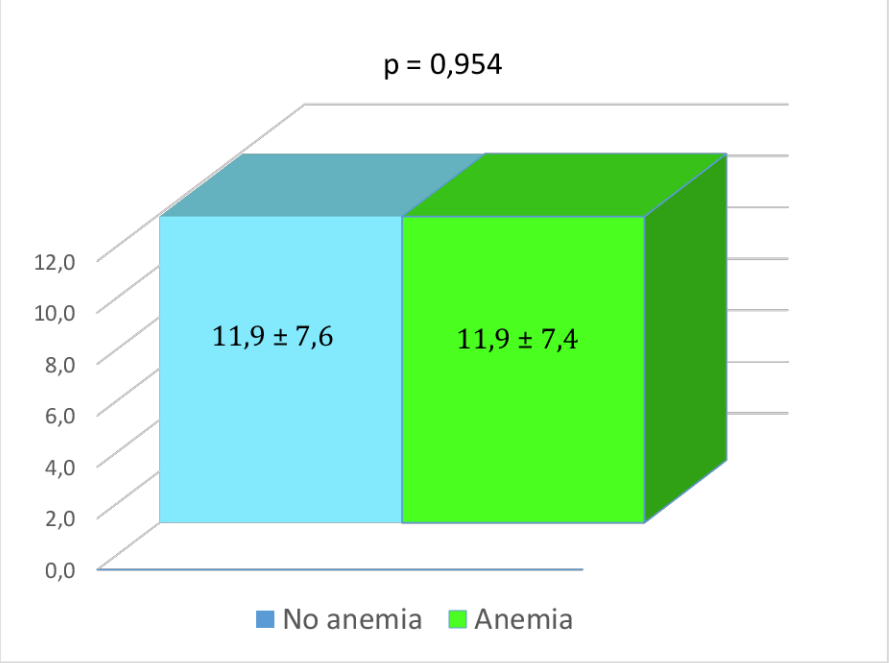


Figura 10: Durata del ricovero ospedaliero in pazienti con e senza anemia

Studiando l'associazione tra durata del ricovero e **deficit di acido folico** è emerso che nei pazienti che avevano deficit di acido folico la durata del ricovero era di 13,1 giorni, mentre nei pazienti senza tale deficit la durata del ricovero era di 13,3 giorni, p=0,849, quindi non c'è differenza tra i 2 gruppi.

Abbiamo infine studiato l'associazione tra durata del ricovero e **deficit di vitamina B_{12}** ed è emerso che nei pazienti che avevano deficit di vitamina B_{12} la durata del ricovero era di 11,6 giorni, mentre nei pazienti senza tale deficit la durata del ricovero era 13,4 giorni, p=0,336, per cui anche in questo caso non c'è differenza tra i 2 gruppi.

4. Discussione

Nel nostro studio, i livelli di vitamina B_{12} e acido folico nei pazienti con **anemia** non sono risultati più bassi rispetto ai pazienti senza anemia, per cui ci saranno pazienti con deficit di vitamina B_{12} e acido folico che non hanno anemia.
Per quanto riguarda la correlazione tra l'anemia e i dati anamnestici, è risultato che chi aveva scompenso cardiaco aveva una probabilità del 30% in più di avere anemia rispetto a chi non aveva lo scompenso cardiaco, in maniera significativa; inoltre i pazienti con BPCO avevano minore prevalenza di anemia rispetto a chi non aveva la BPCO, in maniera significativa.

Dal nostro studio è emerso anche che la **prevalenza** di deficit di **acido folico** è molto elevata nella popolazione grande anziana (8,1%), mentre la prevaleza di deficit di vitamina **B_{12}** è del 2,1%. Tra coloro che avevano anemia il 30,7% aveva anemia da deficit di acido folico, una prevalenza alta, mentre l'8% aveva anemia da deficit di vitamina B_{12}.
Nell'anziano l'MCV non è indicativo del tipo di anemia: si è visto che nell'anemia da **deficit di acido folico** l'MCV non era maggiore, per cui l'MCV non è un parametro affidabile per il tipo di anemia. Dai dati della letteratura sappiamo infatti che nell'anziano spesso l'anemia è mista: possiamo avere contemporaneamente anemia sideropenica, in cui si ha microcitosi, e anemia da deficit di vitamina B_{12} o acido folico, in cui si ha macrocitosi.
I livelli di emoglobina non erano tanto diversi tra soggetti con **deficit di vitamina B_{12}** e soggetti senza tale deficit perché l'anemia probabilmente era dovuta ad altre cause. I soggetti con deficit di vitamina B_{12} avevano maggiore prevalenza di demenza: c'era una probabilità di 2,3 volte maggiore di avere demenza nei soggetti con deficit di vitamina B_{12} rispetto ai soggetti senza tale deficit, anche se non in modo statisticamente significativo. Dalla letteratura sappiamo che sia il deficit di

vitamina B_{12} che il deficit di acido folico correlano con la demenza; dopo la somministrazione di vitamina B_{12} o folato, nei pazienti con demenza si possono avere vari gradi di miglioramento, dipendentemente dalla severità della malattia e dalla sua durata.

Per quanto riguarda gli **outcome**, dal nostro studio è emerso che nè l'anemia in sè, nè il deficit di vitamina B_{12}, nè il deficit di acido folico avevano impatto sulla mortalità nei grandi anziani ospedalizzati o erano predittivi della durata del ricovero.

5. Conclusioni

Possiamo quindi concludere che nel grande anziano la prevalenza del deficit di folato e di anemia da deficit di folato è molto elevata.

L'MCV non è un parametro affidabile per definire il tipo di anemia poiché spesso nel grande anziano le anemie sono miste, adesempio anemia sideropenica e anemia da deficit di vitamina B_{12} o folato.

Il deficit di vitamina B_{12} correla con la demenza, ed è quindi molto importante valutarne i livelli nei grandi anziani.

Per quanto riguarda gli outcome, nè l'anemia in sè, nè il deficit di vitamina B_{12}, nè il deficit di acido folico hanno impatto sulla mortalità nei grandi anziani ospedalizzati o sono predittivi della durata del ricovero.

BIBLIOGRAFIA

1. Moreno Chulilla, J. A., Romero Colás, M. S. & Gutiérrez Martín, M. Classification of anemia for gastroenterologists. *World J. Gastroenterol. WJG* **15**, 4627–4637 (2009).

2. Pang, W. W. & Schrier, S. L. Anemia in the elderly. *Curr. Opin. Hematol.* **19**, 133–140 (2012).

3. Horowitz, K. M., Ingardia, C. J. & Borgida, A. F. Anemia in pregnancy. *Clin. Lab. Med.* **33**, 281–291 (2013).

4. Billett, H. H. Hemoglobin and Hematocrit. in *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations* (eds. Walker, H. K., Hall, W. D. & Hurst, J. W.) (Butterworths, 1990).

5. Sarma, P. R. Red Cell Indices. in *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations* (eds. Walker, H. K., Hall, W. D. & Hurst, J. W.) (Butterworths, 1990).

6. Zivot, A., Lipton, J. M., Narla, A. & Blanc, L. Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. *Mol. Med.* **24**, (2018).

7. Rai, D., Wilson, A. M. & Moosavi, L. Histology, Reticulocytes. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).

8. Schoener, B. & Borger, J. Erythropoietin. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).

9. Jameson *et al. Harrison's Principles of Internal Medicine*.

10. Turner, J., Parsi, M. & Badireddy, M. Anemia. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).

11. Gaskell, H., Derry, S., Andrew Moore, R. & McQuay, H. J. Prevalence of anaemia in older persons: systematic review. *BMC Geriatr.* **8**, 1 (2008).

12. PubMed entry.

13. Stauder, R., Valent, P. & Theurl, I. Anemia at older age: etiologies, clinical implications, and management. *Blood* **131**, 505–514 (2018).

14. Nutritional anaemias. Report of a WHO scientific group. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* **405**, 5–37 (1968).

15. Culleton, B. F. *et al.* Impact of anemia on hospitalization and mortality in older adults. *Blood* **107**, 3841–3846 (2006).

16. Denny, S. D., Kuchibhatla, M. N. & Cohen, H. J. Impact of anemia on mortality, cognition, and function in community-dwelling elderly. *Am. J. Med.* **119**, 327–334 (2006).

17. Abrahamsen, J. F. *et al.* Readmission and mortality one year after acute hospitalization in older patients with explained and unexplained anemia - a prospective observational cohort study. *BMC Geriatr.* **16**, (2016).

18. Stauder, R. & Thein, S. L. Anemia in the elderly: clinical implications and new therapeutic concepts. *Haematologica* **99**, 1127–1130 (2014).

19. Ahmed, T. & Haboubi, N. Assessment and management of nutrition in older people and its importance to health. *Clin. Interv. Aging* **5**, 207–216 (2010).

20. Gordon, S. R., Smith, R. E. & Power, G. C. The role of endoscopy in the evaluation of iron deficiency anemia in patients over the age of 50. *Am. J. Gastroenterol.* **89**, 1963–1967 (1994).

21. Goodnough, L. T. & Schrier, S. L. Evaluation and management of anemia in the elderly. *Am. J. Hematol.* **89**, 88–96 (2014).

22. Rockey, D. C. & Cello, J. P. Evaluation of the gastrointestinal tract in patients with iron-deficiency anemia. *N. Engl. J. Med.* **329**, 1691–1695 (1993).

23. Casale, G., Bonora, C., Migliavacca, A., Zurita, I. E. & de Nicola, P. Serum ferritin and ageing. *Age Ageing* **10**, 119–122 (1981).

24. Bianchi, V. E. Role of nutrition on anemia in elderly. *Clin. Nutr. ESPEN* **11**, e1–e11 (2016).

25. Rimon, E. *et al.* Diagnosis of iron deficiency anemia in the elderly by transferrin receptor-ferritin index. *Arch. Intern. Med.* **162**, 445–449 (2002).

26. Hughes, D. A., Stuart-Smith, S. E. & Bain, B. J. How should stainable iron in bone marrow films be assessed? *J. Clin. Pathol.* **57**, 1038–1040 (2004).

27. Means, R. T. & Krantz, S. B. Inhibition of human erythroid colony-forming units by gamma interferon can be corrected by recombinant human erythropoietin. *Blood* **78**, 2564–2567 (1991).

28. Theurl, I. *et al.* Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood* **113**, 5277–5286 (2009).

29. Weiss, G. & Goodnough, L. T. Anemia of chronic disease. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1011–1023 (2005).

30. Theurl, I. *et al.* On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nat. Med.* **22**, 945–951 (2016).

31. Lupescu, A. *et al.* Enhanced suicidal erythrocyte death contributing to anemia in the elderly. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **36**, 773–783 (2015).

32. Baylis, D., Bartlett, D. B., Patel, H. P. & Roberts, H. C. Understanding how we age: insights into inflammaging. *Longev. Heal.* **2**, 8 (2013).

33. Cartwright, G. E. The anemia of chronic disorders. *Semin. Hematol.* **3**, 351–375 (1966).

34. Guralnik, J. M., Eisenstaedt, R. S., Ferrucci, L., Klein, H. G. & Woodman, R. C. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia. *Blood* **104**, 2263–2268 (2004).

35. Makipour, S., Kanapuru, B. & Ershler, W. B. Unexplained Anemia in the Elderly. *Semin. Hematol.* **45**, 250–254 (2008).

36. Artz, A. S. & Thirman, M. J. Unexplained anemia predominates despite an intensive evaluation in a racially diverse cohort of older adults from a referral anemia clinic. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **66**, 925–932 (2011).

37. Price, E. A., Mehra, R., Holmes, T. H. & Schrier, S. L. Anemia in older persons: etiology and evaluation. *Blood Cells. Mol. Dis.* **46**, 159–165 (2011).

38. Stover, P. J. Vitamin B12 and older adults. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **13**, 24–27 (2010).

39. Baik, H. W. & Russell, R. M. Vitamin B12 deficiency in the elderly. *Annu. Rev. Nutr.* **19**, 357–377 (1999).

40. Hughes, C. F., Ward, M., Hoey, L. & McNulty, H. Vitamin B12 and ageing: current issues and interaction with folate. *Ann. Clin. Biochem.* **50**, 315–329 (2013).

41. Herbert, V. Staging vitamin B-12 (cobalamin) status in vegetarians. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**, 1213S-1222S (1994).

42. Carmel, R. Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu. Rev. Med.* **51**, 357–375 (2000).

43. Snow, C. F. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Arch. Intern. Med.* **159**, 1289–1298 (1999).

44. Seetharam, B., Alpers, D. H. & Allen, R. H. Isolation and characterization of the ileal receptor for intrinsic factor-cobalamin. *J. Biol. Chem.* **256**, 3785–3790 (1981).

45. Scott, J. M. Bioavailability of vitamin B12. *Eur. J. Clin. Nutr.* **51 Suppl 1**, S49-53 (1997).

46. Berlin, H., Berlin, R. & Brante, G. Oral treatment of pernicious anemia with high doses of vitamin B12 without intrinsic factor. *Acta Med. Scand.* **184**, 247–258 (1968).

47. Nexo, E. & Hoffmann-Lücke, E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am. J. Clin. Nutr.* **94**, 359S-365S (2011).

48. Vallance, P. Homocysteine in Health and Disease. *J. R. Soc. Med.* **95**, 159 (2002).

49. Andrès, E. *et al.* Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* **171**, 251–259 (2004).

50. Scott, J. & Weir, D. Folate/vitamin B12 inter-relationships. *Essays Biochem.* **28**, 63–72 (1994).

51. Wong, C. W. Vitamin B12 deficiency in the elderly: is it worth screening? *Hong Kong Med. J. Xianggang Yi Xue Za Zhi* **21**, 155–164 (2015).

52. Nilsson-Ehle, H. Age-related changes in cobalamin (vitamin B12) handling. Implications for therapy. *Drugs Aging* **12**, 277–292 (1998).

53. Briddon, A. Homocysteine in the context of cobalamin metabolism and deficiency states. *Amino Acids* **24**, 1–12 (2003).

54. Chatthanawaree, W. Biomarkers of cobalamin (vitamin B12) deficiency and its application. *J. Nutr. Health Aging* **15**, 227–231 (2011).

55. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of the randomized trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **82**, 806–812 (2005).

56. McKinley, M. C. *et al.* Low-dose vitamin B-6 effectively lowers fasting plasma homocysteine in healthy elderly persons who are folate and riboflavin replete. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 759–764 (2001).

57. Refsum, H. *et al.* Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin. Chem.* **50**, 3–32 (2004).

58. Frosst, P. *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* **10**, 111–113 (1995).

59. Ueland, P. M. *et al.* Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin. Chem.* **39**, 1764–1779 (1993).

60. Hoey, L., Strain, J. J. & McNulty, H. Studies of biomarker responses to intervention with vitamin B-12: a systematic review of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**, 1981S-1996S (2009).

61. Savage, D. G., Lindenbaum, J., Stabler, S. P. & Allen, R. H. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am. J. Med.* **96**, 239–246 (1994).

62. Miller, J. W. Assessing the association between vitamin B-12 status and cognitive function in older adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**, 1259–1260 (2006).

63. Solomon, L. R. Disorders of cobalamin (vitamin B12) metabolism: emerging concepts in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev.* **21**, 113–130 (2007).

64. Dali-Youcef, N. & Andrès, E. An update on cobalamin deficiency in adults. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians* **102**, 17–28 (2009).

65. Carmel, R. Cobalamin, the stomach, and aging. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**, 750–759 (1997).

66. Scott, J. M. Folate and vitamin B12. *Proc. Nutr. Soc.* **58**, 441–448 (1999).

67. Pruthi, R. K. & Tefferi, A. Pernicious anemia revisited. *Mayo Clin. Proc.* **69**, 144–150 (1994).

68. Carmel, R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *Am. J. Clin. Nutr.* **94**, 348S-358S (2011).

69. Hathcock, J. N. & Troendle, G. J. Oral cobalamin for treatment of pernicious anemia? *JAMA* **265**, 96–97 (1991).

70. van Asselt, D. Z. *et al.* Role of cobalamin intake and atrophic gastritis in mild cobalamin deficiency in older Dutch subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 328–334 (1998).

71. Carmel, R., Perez-Perez, G. I. & Blaser, M. J. Helicobacter pylori infection and food-cobalamin malabsorption. *Dig. Dis. Sci.* **39**, 309–314 (1994).

72. Richter, J. E., Peura, D., Benjamin, S. B., Joelsson, B. & Whipple, J. Efficacy of omeprazole for the treatment of symptomatic acid reflux disease without esophagitis. *Arch. Intern. Med.* **160**, 1810–1816 (2000).

73. Mitchell, S. L. & Rockwood, K. The association between antiulcer medication and initiation of cobalamin replacement in older persons. *J. Clin. Epidemiol.* **54**, 531–534 (2001).

74. Carmel, R., Green, R., Rosenblatt, D. S. & Watkins, D. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 62–81 (2003) doi:10.1182/asheducation-2003.1.62.

75. von Castel-Dunwoody, K. M. *et al.* Transcobalamin 776C->G polymorphism negatively affects vitamin B-12 metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 1436–1441 (2005).

76. Dharmarajan, T. S., Adiga, G. U. & Norkus, E. P. Vitamin B12 deficiency. Recognizing subtle symptoms in older adults. *Geriatrics* **58**, 30–34, 37–38 (2003).

77. Wang, X. *et al.* Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *Lancet Lond. Engl.* **369**, 1876–1882 (2007).

78. Spence, J. D., Bang, H., Chambless, L. E. & Stampfer, M. J. Vitamin Intervention For Stroke Prevention trial: an efficacy analysis. *Stroke* **36**, 2404–2409 (2005).

79. Clarke, R. *et al.* Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **55**, 1449–1455 (1998).

80. Wald, D. S., Kasturiratne, A. & Simmonds, M. Serum homocysteine and dementia: meta-analysis of eight cohort studies including 8669 participants. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* **7**, 412–417 (2011).

81. Smith, A. D. *et al.* Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *PloS One* **5**, e12244 (2010).

82. de Jager, C. A., Oulhaj, A., Jacoby, R., Refsum, H. & Smith, A. D. Cognitive and clinical outcomes of homocysteine-lowering B-vitamin treatment in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **27**, 592–600 (2012).

83. Dhonukshe-Rutten, R. A. M. *et al.* Vitamin B-12 status is associated with bone mineral content and bone mineral density in frail elderly women but not in men. *J. Nutr.* **133**, 801–807 (2003).

84. Ellenberg, S. S., Orloff, D. G. & Temple, R. J. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1027–1030; author reply 1027-1030 (2004).

85. Melton, M. E. & Kochman, M. L. Reversal of severe osteoporosis with vitamin B12 and etidronate therapy in a patient with pernicious anemia. *Metabolism.* **43**, 468–469 (1994).

86. Stabler, S. P. Clinical practice. Vitamin B12 deficiency. *N. Engl. J. Med.* **368**, 149–160 (2013).

87. Toh, B.-H., Chan, J., Kyaw, T. & Alderuccio, F. Cutting edge issues in autoimmune gastritis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **42**, 269–278 (2012).

88. Bor, M. V. *et al.* Long term biweekly 1 mg oral vitamin B12 ensures normal hematological parameters, but does not correct all other markers of vitamin B12 deficiency. A study in patients with inherited vitamin B12 deficiency. *Haematologica* **93**, 1755–1758 (2008).

89. Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline. *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. (National Academies Press (US), 1998).

90. Bor, M. V., Lydeking-Olsen, E., Møller, J. & Nexø, E. A daily intake of approximately 6 microg vitamin B-12 appears to saturate all the vitamin B-12-related variables in Danish postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 52–58 (2006).

91. Lökk, J. News and views on folate and elderly persons. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **58**, 354–361 (2003).

92. Marcus, D. L. & Freedman, M. L. Folic acid deficiency in the elderly. *J. Am. Geriatr. Soc.* **33**, 552–558 (1985).

93. Herbert, V., Larrabee, A. R. & Buchanan, J. M. Studies on the identification of a folate compound of human serum. *J. Clin. Invest.* **41**, 1134–1138 (1962).

94. Reynolds, E. H. Mental effects of anticonvulsants, and folic acid metabolism. *Brain J. Neurol.* **91**, 197–214 (1968).

95. Reynolds, E. H. Benefits and risks of folic acid to the nervous system. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **72**, 567–571 (2002).

96. Reynolds, E. H. Folic acid, ageing, depression, and dementia. *BMJ* **324**, 1512–1515 (2002).

97. Nilsson, K., Gustafson, L. & Hultberg, B. Plasma homocysteine is a sensitive marker for tissue deficiency of both cobalamines and folates in a psychogeriatric population. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **10**, 476–482 (1999).

98. Savage, D. G., Lindenbaum, J., Stabler, S. P. & Allen, R. H. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am. J. Med.* **96**, 239–246 (1994).

99. Joosten, E. *et al.* Cobalamin absorption and serum homocysteine and methylmalonic acid in elderly subjects with low serum cobalamin. *Eur. J. Haematol.* **51**, 25–30 (1993).

100. Haller, J. The vitamin status and its adequacy in the elderly: an international overview. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Vitam.- Ernahrungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr.* **69**, 160–168 (1999).

101. Kilshaw, P. J., Heppell, L. M. & Ford, J. E. Effects of heat treatment of cow's milk and whey on the nutritional quality and antigenic properties. *Arch. Dis. Child.* **57**, 842–847 (1982).

102. Russell, R. M. *et al.* Folic acid malabsorption in atrophic gastritis. Possible compensation by bacterial folate synthesis. *Gastroenterology* **91**, 1476–1482 (1986).

103. Vreugdenhil, G., Wognum, A. W., van Eijk, H. G. & Swaak, A. J. Anaemia in rheumatoid arthritis: the role of iron, vitamin B12, and folic acid deficiency, and erythropoietin responsiveness. *Ann. Rheum. Dis.* **49**, 93–98 (1990).

104. Verhoeff, B. J., Trip, M. D., Prins, M. H., Kastelein, J. J. & Reitsma, P. H. The effect of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation on levels of homocysteine, folate, vitamin B12 and on the risk of premature atherosclerosis. *Atherosclerosis* **141**, 161–166 (1998).

105. Cravo, M. L. *et al.* Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status. *Am. J. Clin. Nutr.* **63**, 220–224 (1996).

106. Bell, I. R. *et al.* Vitamin B12 and folate status in acute geropsychiatric inpatients: affective and cognitive characteristics of a vitamin nondeficient population. *Biol. Psychiatry* **27**, 125–137 (1990).

107. Selhub, J., Bagley, L. C., Miller, J. & Rosenberg, I. H. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 614S-620S (2000).

108. Lehmann, M., Gottfries, C. G. & Regland, B. Identification of cognitive impairment in the elderly: homocysteine is an early marker. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **10**, 12–20 (1999).

109. Botez, M. I., Fontaine, F., Botez, T. & Bachevalier, J. Folate-responsive neurological and mental disorders: report of 16 cases. Neuropsychological correlates of computerized transaxial tomography and radionuclide cisternography in folic acid deficiencies. *Eur. Neurol.* **16**, 230–246 (1977).

110. Reynolds, E. H., Preece, J. M., Bailey, J. & Coppen, A. Folate deficiency in depressive illness. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* **117**, 287–292 (1970).

111. Sneath, P., Chanarin, I., Hodkinson, H. M., McPherson, C. K. & Reynolds, E. H. Folate status in a geriatric population and its relation to dementia. *Age Ageing* **2**, 177–182 (1973).

112. Botez, M. I. & Bachevalier, J. The blood-brain barrier and folate deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* **34**, 1725–1730 (1981).

113. Hemmer, B., Glocker, F. X., Schumacher, M., Deuschl, G. & Lücking, C. H. Subacute combined degeneration: clinical, electrophysiological, and magnetic resonance imaging findings. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **65**, 822–827 (1998).

114. Arnesen, E. *et al.* Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int. J. Epidemiol.* **24**, 704–709 (1995).

115. Malinow, M. R., Nieto, F. J., Szklo, M., Chambless, L. E. & Bond, G. Carotid artery intimal-medial wall thickening and plasma homocyst(e)ine in asymptomatic adults. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation* **87**, 1107–1113 (1993).

116. Kim, Y. I. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J. Nutr. Biochem.* **10**, 66–88 (1999).

117. Choi, S.-W. & Mason, J. B. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J. Nutr.* **132**, 2413S-2418S (2002).

118. Giovannucci, E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *J. Nutr.* **132**, 2350S-2355S (2002).

119. Botez, M. I., Young, S. N., Bachevalier, J. & Gauthier, S. Effect of folic acid and vitamin B12 deficiencies on 5-hydroxyindoleacetic acid in human cerebrospinal fluid. *Ann. Neurol.* **12**, 479–484 (1982).

120. Martin, D. C., Francis, J., Protetch, J. & Huff, F. J. Time dependency of cognitive recovery with cobalamin replacement: report of a pilot study. *J. Am. Geriatr. Soc.* **40**, 168–172 (1992).