

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA



VALORACIÓN DE LAS VITAMINAS DEL GRUPO B EN
POBLACIÓN DE RIESGO

TESIS DOCTORAL
RICARDO SOLA GARCÍA



DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA
Facultad de Medicina
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**MANUEL J CASTILLO GARZON, CATEDRATIDO DE FISIOLOGIA MEDICA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.**

CERTIFICA:

Que Don **RICARDO SOLA GARCIA** ha realizado bajo mi dirección el trabajo original de investigación titulado: **“VALORACIÓN DE LAS VITAMINAS DEL GRUPO B EN POBLACIÓN DE RIESGO”**.

El que suscribe ha seguido el desarrollo experimental del trabajo, particularmente en lo referente al diseño y obtención de resultados, considerando dicho trabajo apto para ser presentado como Tesis Doctoral y sometido a la consideración del Tribunal que designe la Universidad de Granada.

Fdo. Manuel J Castillo Garzón

Granada 1 de Septiembre de 2006



DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
Facultad de Medicina
UNIVERSIDAD DE GRANADA

MARCELA GONZALEZ GROSS, PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE FISILOGIA DE LA UNIVERSIDAD POLITECNICA DE MADRID.

CERTIFICA:

Que Don **RICARDO SOLA GARCIA** ha realizado bajo mi dirección el trabajo original de investigación titulado: **“VALORACIÓN DE LAS VITAMINAS DEL GRUPO B EN POBLACIÓN DE RIESGO”**.

El que suscribe ha seguido el desarrollo experimental del trabajo, particularmente en lo referente al diseño y obtención de resultados, considerando dicho trabajo apto para ser presentado como Tesis Doctoral y sometido a la consideración del Tribunal que designe la Universidad de Granada.

Fdo. Marcela Gonzalez Gross
Granada 1 de Septiembre de 2006



**Dpt. Pathophysiology of Human Nutrition.
Institute of Nutrition.
University of Bonn.**

**KLAUS PIETRZIK, CATEDRÁTICO DE FISIOPATOLOGÍA DE LA NUTRICIÓN
DE LA UNIVERSIDAD DE BONN. ALEMANIA.**

CERTIFICA:

Que Don **RICARDO SOLA GARCIA** ha realizado bajo mi dirección el trabajo original de investigación titulado: **“VALORACIÓN DE LAS VITAMINAS DEL GRUPO B EN POBLACIÓN DE RIESGO”**.

El que suscribe ha seguido el desarrollo experimental del trabajo, particularmente en lo referente al diseño y obtención de resultados, considerando dicho trabajo apto para ser presentado como Tesis Doctoral y sometido a la consideración del Tribunal que designe la Universidad de Granada.

Fdo. Klaus Pietrzik
Granada 1 de Septiembre de 2006

ÍNDICE

Introducción	1
Hipótesis y Objetivos	8
Homocisteína y patología cardiovascular	12
Introducción	15
Base Bioquímica de la hiperhomocisteinemia	16
Metabolismo de la homocisteína	16
Hiperhomocisteinemia congénita	17
Hiperhomocisteinemia adquirida	19
Folato	19
Vitamina B ₁₂	20
Vitamina B ₆	20
Vitamina B ₂	20
Hiperhomocisteinemia y envejecimiento	21
Hiperhomocisteinemia relacionada con cambios hormonales	21
Hiperhomocisteinemia ligada a cambios en el estilo de vida	22
Diagnóstico de la hiperhomocisteinemia	23
Indicaciones de la medida de homocisteína	24
La hiperhomocisteinemia como factor de riesgo cardiovascular	25
Fisiopatología de la lesión vascular por la hiperhomocisteinemia	26
Tratamiento de la hiperhomocisteinemia	27
Prevención de la hiperhomocisteinemia	28
Conclusiones	29
Bibliografía	31
El Folato	44
Introducción	46
Folato, folatos y ácido fólico	46
Fisiología del folato	47
Bioquímica del folato	48
Genética	48
Déficit clínico	49
Déficit subclínico	51
Metodología diagnóstica	57
Tratamiento	59
Profilaxis	60

Niveles máximos tolerables	62
Conclusiones	62
Bibliografía	64
Vitamina B₁₂	79
Introducción	81
Absorción, transporte, depósitos y excreción	81
Déficit Clínico	82
Déficit subclínico	85
Diagnóstico	87
Cuadro hemático	87
B ₁₂ sérica	87
Ácido metilmalónico	89
Homocisteína	89
Holotranscobalamina II	91
Pepsinógeno	91
Gastrina	92
Anticuerpos anti células parietales	92
Anticuerpos anti factor intrínseco	92
Médula ósea	92
Bioquímica	93
Test de síntesis de la Timidina	93
Test de Schilling	94
Resonancia magnética	95
Diagnóstico	95
Factores que afectan los niveles de B ₁₂	96
Tratamiento	99
Prevención	100
Conclusiones	101
Bibliografía	107
Vitamina B₆	130
Introducción	134
Metabolismo	134
Funciones y enzimas dependientes de la vitamina B ₆	136
Medida de la vitamina B ₆	137
Fisiopatología de la vitamina B ₆	141
Anemia por déficit de vitamina B ₆	142
Función Inmune	142

Cáncer	144
Función cognitiva	147
Enfermedad cardiovascular y homocisteína	150
Tratamiento	151
Profilaxis	153
Fortificación alimenticia	154
Toxicidad	155
Bibliografía	165
Material y métodos	168
Vitaminas B y homocisteína en ancianos institucionalizados	183
Introducción	186
Material y métodos	188
Resultados	190
Discusión	191
Bibliografía	197
Diagnóstico precoz de la deficiencia de B₁₂	206
Introducción	209
Material y métodos	210
Resultados	214
Discusión	215
Bibliografía	217
MTHFR	220
Introducción	221
Objetivos	222
Métodos	222
Análisis estadístico	223
Resultados	224
Conclusiones	225
Bibliografía	226
Homocisteína en adolescentes	241
Introducción	244
Métodos	245
Resultados	247

Discusión	249
Conclusiones	253
Bibliografía	254
El Estudio AVENA	264
Introducción	267
Métodos	268
Resultados	272
Discusión	273
Bibliografía	276
Discusión general	284
Resumen	288
Congresos	291

ABREVIATURAS:

AD	Alzheimer's disease (Enfermedad de Alzheimer)
ADE	Índice de dispersión eritrocitaria
AGEs	Advanced Glycation end Products (productos finales de la glicosilación)
AH	Adenosil homocisteína
AMM	Ácido Metilmalónico
AOPPs	Advanced Oxidation Protein Products (productos proteicos oxidativos)
ATP	
AVENA	Alimentación y Valoración del Estado Nutricional en Adolescentes
B ₂	Vitamina B ₂
B ₆	Vitamina B ₆
B ₁₂	Vitamina B ₁₂
BHMT	Betaína homocisteína metil transferasa
BMI	Body mass index
CATCH	Child and Adolescent Trial for Cardiovascular Health
Cbl	Cobalamina
CBL	Cistationina-β-liasa
CBS	Cistationina-β-sintetasa
CEE	Comunidad Económica Europea
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
CNS	Central nervous system (Sistema nervioso central)
CPC	Coronariopatía crónica
CRP, ESR, CI OR	vitamina B ₆
CV	Coeficiente de variación
CVD	Cardiovascular disease (Enfermedad cardiovascular)
CVF	Cardiovascular fitness
DACH	vitamina B ₆
DFE	Dietary folate equivalent
DiagS	Diagnostic Scheme
DNA	
DOPA	3,4-dihydroxyphenylalanine (Dihidrofenilalanina)
DRI	Dietary Reference Intakes
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
dUMP	Desoxiuridina monofosfato

ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	
EEG	Electroencefalograma
FAD	Flavin adenin dinucleotido
FBP	Proteína fijadora de folato
FE	Folato intraeritrocitario
FI	Factor intrínseco de Castle
FIT	The Family Intervention Trial
fl	Fentolitros
FRCV	Factores de riesgo cardiovasculares
FS	Folato sérico
GABA	conversion of glutamic acid to γ -aminobutyric-acid
γ GT	
GM	Geometric mean
GOT	
GPT	
HCM	Hemoglobina corpuscular media
Hcy	Homocysteine (Homocisteína)
HDL cholesterol	
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
Holo-TC-II	Holotranscobalamina II
HPLC	High-performance liquid chromatography (Cromatografía de alta resolución)
IL	Índice de lobularidad
IOTF	The International Obesity Task Force
IST	Índice de saturación de la transferrina
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDH	Láctico dehidrogenasa
LDL-Colesterol	
LP(a)	
LUC	Células grandes no teñidas
MMA	Methylmalonic Acid (Acido Metilmalónico)
MMT	Mini Mental Test
MNA	Mini Nutricional Assessment
MS	Metionina sintetasa
MS-GC	
5-MTHF	5-Metil-tetrahidrofolato
MTHFR	Metil-tetrahidrofolato reductasa
MTRR	Metionina sintetasa reductasa

NDNS	The National Diet and Nutrition Survey
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NTD	Defectos del tubo neural
NIH	National Institute of Health
OMS	Organización Mundial de la salud
ON	Oxido nítrico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramos
PGA	ácido pteroilmonoglutámico
PL	Pyridoxal (Piridoxal)
PLP	pyridoxal 5'-phosphate (Piridoxal fosfato)
PM	Pyridoxamine (Piridoxamina)
PMP	pyridoxamin-5'-phosphate (Piridoxamina 5 fosfato)
PN	Pyridoxine (Piridoxina)
PNP	pyridoxine 5'-phosphate (Piridoxina 5 fosfato), and
RBC	red blood cell
RDA	
RIA	Radioinmunoanálisis
RNA	
RR	Riesgo relativo
SAH	S-adenosil-homocisteina
SAM	S-adenosylmethionine (S-adenosil-metionina)
SCbl	Serum cobalamin
SD	Standard deviations (
SHMT	Serine-hydroxymethyltransferase (Serina hidroximetiltransferasa)
SNC	Sistema nervioso central
sTfR	Receptores solubles de la transferrina
TC-II	Transcobalamina II
THF	Tetrahydrofolate (Tetrahidrofolato)
tHcy	Homocisteína total
VCM	Volumen corpuscular medio
VLDL-Colesterol	
VPM	Volumen plaquetario medio
XA	Xanthurenic acid (Ácido xanturénico)
α -EALT	Alanine aminotransferase ()
α -EAST	Erythrocyte aspartate aminotransferase ()

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la salud como un estado de completo bienestar físico, mental y social. Por tanto, el mantenimiento de un estado funcional óptimo hasta una edad avanzada es esencial para poder hablar de calidad de vida. De todo esto nace la necesidad de valorar el estado nutricional a través del déficit vitamínico y en minerales que pueden influir en el deterioro físico y mental.

En esta tesis confluyen dos temas de máxima actualidad e interés: la tercera edad y las vitaminas del grupo B prestando especial atención a las vitaminas B₆, B₁₂ y folato. Estas tres vitaminas intervienen de forma directa en el metabolismo de la metionina, provocando en caso de déficit hiperhomocisteinemia, factor de riesgo independiente de enfermedades cardiovasculares y degenerativas¹, cáncer, osteoporosis, enfermedad de Alzheimer y otras demencias¹³, enfermedad de Parkinson, cataratas, degeneración macular senil, trastornos gástricos y complicaciones de la diabetes.

Cabe destacar que en cuanto a las vitaminas ha ocurrido un fenómeno curioso. Probablemente en ningún campo de la nutrición en menos años se adquirieron mayor cantidad de conocimientos. Desde que Casimiro Funk describe la primera en 1912, en sólo veinte años, se identifican los compuestos responsables que reciben el nombre de vitaminas, se sintetizan todas ellas y se consideró que se había llegado al conocimiento completo de su fisiopatología. Sin embargo, en los últimos años, el panorama ha cambiado y las vitaminas vuelven a estar de extraordinaria actualidad. Se debe ello a que se pensaba que las desnutriciones vitamínicas estaban prácticamente erradicadas y correspondían a épocas pasadas o en las actuales a grupos geográficamente muy marginados. Pero los estudios científicos han puesto de manifiesto la aparición de casuísticas de desnutriciones vitamínicas en individuos pertenecientes a status acomodados del mundo desarrollado, en el cual se seguía pensando que el problema era la sobrealimentación.

De todas las vitaminas, una de las que mayor interés despierta es la vitamina B₁₂, constituye un importante problema de salud pública, objeto de renovada y creciente atención²⁻⁵. De hecho, aunque la vitamina B₁₂ no suele ser deficitaria en la población general, sí lo es en determinados grupos de riesgo, como son ancianos^{2,4,6} y vegetarianos¹².

Resultados preliminares de nuestro estudio confirman nuestra hipótesis de que en España el problema es similar al de otros países de nuestro entorno, encontrándose un déficit subclínico en al menos un 22% de la población anciana estudiada⁷.

La vitamina B₁₂ está ausente en los vegetales, encontrándose casi exclusivamente en los alimentos de origen animal. La excepción es la B₁₂ que se produce por microorganismos y está presente en los alimentos. Como dato curioso hay que indicar que miembros del presente grupo de investigación hemos comprobado que en poblaciones desnutridas, habitantes de países con bajo nivel de desarrollo (por ejemplo la India), la contaminación de agua y alimentos por micro-organismos determina un aporte de B₁₂ que, a pesar de la extrema desnutrición, evita o atenúa las consecuencias de su déficit. Esto no ocurre, lógicamente, en habitantes de países desarrollados donde la contaminación por microorganismos de los alimentos que se consumen es mínima, especialmente cuando el preparado y cocinados de los mismos se realiza en condiciones de gran higiene como ocurre en las residencias de ancianos.

Las necesidades metabólicas diarias de B₁₂ son 5 mcg, de ellos 1-2 mcg se absorben al partir de los alimentos y el resto proviene de la B₁₂ almacenada en el hígado. Tras la absorción, la B₁₂ se transfiere a una proteína de transporte, la transcobalamina II (TC-II). El complejo TC-II-B₁₂ es la holotranscobalamina-II (Holo-TC-II), forma biológicamente activa de la vitamina B₁₂.

Muchos de estos estados de malnutrición concurren en una deficiencia de vitaminas. En estos momentos, existe un gran consenso entre los profesionales de la salud de que el gran problema nutricional de los países desarrollados es la desnutrición, en especial a nivel subclínico, sobre todo en personas de edad avanzada²⁻⁵.

De igual modo, el déficit de folato es también un problema de salud pública, numerosos estudios realizados en todo el mundo han puesto de manifiesto la alta prevalencia de deficiencia de folato en la población, especialmente la anciana. La deficiencia de folato es probablemente el déficit vitamínico más frecuente⁸. Se calcula que alrededor de un tercio de la población presenta deficiencia de folato. Datos preliminares de nuestro estudio indican que alrededor de un 57% presenta niveles bajos de folato sérico y un 38% de folato eritrocitario⁷, este último indicativo de las reservas de folato en el organismo.

La deficiencia subclínica de folato se relaciona con alteraciones del sistema nervioso central (defectos del tubo neural, depresión, demencia senil), cáncer y aterosclerosis.

El metabolismo y función de la vitamina B₁₂ y folato están íntimamente relacionados y son imprescindibles para la síntesis de DNA, maduración del núcleo, división celular y función neurológica. Esto se traduce en unos cambios morfológicos, llamados megaloblásticos, que afectan a todas las series medulares: granulocítica, plaquetaria y eritroide. El déficit clínico de estas vitaminas provoca, en último extremo una entidad clínica específica, la anemia megaloblástica, que en el caso de la deficiencia de vitamina B₁₂, a veces se acompaña de alteraciones neurológicas que llegan a ser irreversibles, de ahí la importancia de un diagnóstico precoz.

En cuanto a la vitamina B₆, en 1926 se produjo dermatitis en ratas alimentadas deficientemente en B₁₂, pero no fue hasta 1936 cuando György distinguió entre vitamina B₁₂ y el factor hidrosoluble cuya deficiencia causó la dermatitis, y la denominó vitamina B₆. Fue en 1939 cuando se descubrió la estructura química de la vitamina, demostrándose que varios compuestos naturales poseen las mismas propiedades biológicas, el piridoxal, piridoxina y piridoxamina.

Las necesidades diarias de esta vitamina establecidas por la RDA son de 2.0 mg/día para los hombres y 1.6 mg/día para las mujeres.

Es imprescindible en el metabolismo de las proteínas. Se encuentra tanto en los alimentos de origen animal como vegetal por lo que el estado deficitario es poco frecuente. Su déficit provoca efectos en la piel, dermatitis seborreica periorbitaria y bucal acompañadas de glositis y estomatitis, efectos sobre el sistema nervioso, crisis convulsivas, neuritis periférica (síndrome del túnel carpiano), depresión⁹, demencia¹⁰ y por último efectos sobre la eritropoyesis provocando anemia.

Por tanto, debido a la problemática expuesta, consideramos de notable interés el proyecto de investigación que se presenta, que no tiene equivalente en la bibliografía, con el fin de identificar algún parámetro o marcador más temprano para detectar precozmente los niveles bajos de la vitamina B₁₂, así como la oportunidad de revisar los valores de referencia establecidos para los niveles séricos e intraeritrocitarios de folato, vitaminas B₁₂ y B₆ y homocisteína. En estos

momentos, en los que se está planteando la necesidad de revisar las ingestas recomendadas de nutrientes para la población española¹¹, los resultados de nuestro estudio sin duda contribuirán a la información científica necesaria para establecer las ingestas recomendadas para el folato, vitamina B₁₂ y B₆.

Bibliografía:

- 1.-Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease. *JAMA* 1995; 274:1049-1057.
- 2.-Chandra RK, Imbach A, Moore C, Skelton D, Woolcott D. Nutrition of the elderly. *CMAJ* 1991;145(11):1475-87
- 3.-Chandra RK. Effect of vitamin and trace-element supplementation on cognitive function in elderly subjects. *Nutrition* 2001;17(9):709-12.
- 4.-Moreiras O, Carbajal A, Perea I & Varela-Moreiras G. The influence of dietary intake and sunlight exposure on the vitamin D status in an elderly Spanish group. *Int. J. Vit. Nutr. Res* 1992; 62: 303-307.
- 5.-Rosenberg IH, Miller JW. Nutritional factors in physical and cognitive functions of elderly people *Am J Clin Nutr* 1992;55(6 Suppl):1237S-1243S.
- 6.-WHO (2000). The World Health Report 2000. www.who.int/whr.
- 7.-M Gonzalez-Gross (1,2), R Sola (1,3), V Lemmen (1,2), D Janke (2), MJ Castillo (1), K Pietrzik (2). Holo-transcobalamin as an early indicator of vitamin b12 deficiency in a group of institutionalized elderly spanish people. *Euromedlab* 2003.
- 8.-Herbert V, Das KC. Folic acid and vitamin B12. En: ME Shils, JA Olson, M Shike, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 8th edition. Malvern, PA: Lea & Febiger, pp 402-425, 1994.
- 9.-Hvas AM, Juul S, Bech P, Nexø E. Vitamin B6 level is associated with symptoms of depresión. *Psychother Psychosom*. 2004 Nov-Dec;73(6):340-3.
- 10.-Grabán A. Hyperhomocysteinemia in patients with dementia. *Neurol Neurochir Pol*. 2003;37(4):879-87.
- 11.-Joyanes M, Gonzalez-Gross M, Marcos A. The need to review the Spanish recommended dietary energy and nutrient intakes. *Eur J Clin Nutr*. 2002 Sep;56(9):899-905.
- 12.-Krajcovicova-Kudlackova M, Blazicek P, Kopcova J, Bederova A, Babinska K. Homocysteine levels in vegetarians versus omnivores. : *Ann Nutr Metab* 2000;44(3):135-8.

13.-Dominguez RO, Marschoff ER, Guareschi EM, Famulari AL, Pagano MA, Serra JA; Collaborative Group for the Study of the Oxidative Stress and Related Abnormalities. Homocysteine, vitamin B 12 and folate in Alzheimer's and vascular dementias: the paradoxical effect of the superimposed type II diabetes mellitus condition. Clin Chim Acta. 2005 Sep;359(1-2):163-70.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS GENERAL

1. El déficit de B₁₂ es un importante problema de salud pública que pasa inicialmente desapercibido.
2. Se puede realizar un diagnóstico (y tratamiento) precoz del déficit de vitamina B₁₂ que es altamente coste-efectivo.
3. Se puede establecer una secuencia específica de alteraciones bioquímicas que informan sobre el nivel evolutivo de un déficit de B₁₂.

HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

1. Ancianos y vegetarianos presentan un déficit subclínico de B₁₂ que puede ser desenmascarado.
2. El déficit de B₁₂ se asocia a pérdidas de memoria, trastornos de la sensibilidad periférica, demencias o incluso Alzheimer. A esto último contribuye la hiperhomocisteinemia (factor independiente de riesgo vascular, proaterogénico y protrombogénico) que es también, en parte, consecuencia del déficit de B₁₂.
3. La medida secuencial de B₁₂ total, polisegmentación neutrófila, MMA, homocisteína, holotranscobalamina permite establecer el nivel de déficit de B₁₂.
5. La medida de holotranscobalamina (forma biológicamente activa de B₁₂) permite realizar un diagnóstico fiable y precoz del déficit de B₁₂.

HIPÓTESIS NULAS

1. En una población supuestamente en riesgo de padecer déficit de B₁₂ no es posible objetivar tal déficit tras medir los distintos parámetros bioquímicos (B₁₂, tHcy, MMA, Holo-TC-II) y hematológicos (polisegmentación de neutrófilos) susceptibles de estar alterados.
2. No existe asociación entre las manifestaciones clínicas del déficit de B₁₂ y la alteración de parámetros biopatológicos.
3. La Holo-TC-II no permite establecer un diagnóstico precoz del déficit de B₁₂.

OBJETIVO GENERAL

- Conocer la relación entre el déficit de B₁₂ y las manifestaciones específicas e inespecíficas que ocasiona.

- Comprobar que existe la posibilidad de detección y tratamiento precoz del déficit de B₁₂.
- Proponer un protocolo de diagnóstico precoz del déficit de B₁₂.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. En poblaciones a riesgo de padecer déficit de B₁₂ (sujetos ancianos institucionalizados y sujetos vegetarianos) medir: B₁₂ plasmática total, tHcy, folato, B₆, Holo-TC-II, polisegmentación de neutrófilos y estudio clínico ad hoc.
2. Establecer la secuencia específica de manifestaciones que acompañan al déficit de B₁₂.
3. Conocer el nivel de asociación entre déficit de B₁₂ y manifestaciones inespecíficas del mismo.
3. Determinar (y en su caso proponer) si la Holo-TC-II constituye un marcador muy precoz del déficit de B₁₂.
4. Comprobar la eficiencia de un protocolo de diagnóstico fiable para detectar precozmente el déficit de B₁₂.

HOMOCISTEÍNA

HOMOCISTEÍNA Y PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR

Marcela González-Gross^{2,3,4}, **Ricardo Sola**^{1,3}, **Klaus Pietrzik**², **Manuel J. Castillo**³

¹ Servicio de Hematología. Hospital Universitario San Cecilio. Granada.
España

² Institut fuer Ernaehrungswissenschaft. Abt. Pathophysiologie der
Ernaehrung. Rheinische Friedrich-Wilhelm Universitaet. Bonn.
Alemania.

³ Facultad de Medicina y Hospital Clínico Universitario. Universidad de
Granada Granada. España.

⁴ Instituto de Nutrición y Bromatología CSIC-UCM. Facultad de
Farmacia. Madrid. España.

Dirección para la correspondencia:

Dra. M Gonzalez-Gross
Instituto de Nutrición y Bromatología CSIC-UCM
Edificio Instituto del Frío
C/ Ramiro de Maeztu, s/n
E-28040 Madrid
Tel: +34 91 549 00 38
Fax: +34 91 549 50 79
Email: mggross@med.ucm.es / mggross@canal21.com

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares, y en particular la cardiopatía isquémica, constituyen la principal causa de muerte en los países occidentales. En la última década se ha reducido notablemente la mortalidad cardiovascular. Esto se atribuye, por un lado, a cambios saludables en el estilo de vida (alimentación, ejercicio físico, tabaco) y por otro, a los avances en la identificación, diagnóstico y tratamiento precoz de diversos factores de riesgo (dislipidemias, hipertensión). A pesar de ello, estas enfermedades seguirán siendo la principal causa de muerte al menos durante los próximos 20 años. De hecho, los factores de riesgo clásicos (dislipidemias, hipertensión, tabaquismo, sedentariedad, stress y obesidad) sólo consiguen explicar un 50% de los episodios de cardiopatía isquémica o lesión cerebrovascular que se producen.

Es importante identificar y controlar otros factores de riesgo que pueden contribuir al desarrollo del proceso aterosclerótico. Uno de los factores que parece jugar un importante papel son los niveles plasmáticos elevados de homocisteína, la cual se considera como un factor independiente de riesgo. La homocisteína es un aminoácido no proteico formado en el ciclo metabólico de la metionina y que interviene en los procesos de metilación. En dicho ciclo metabólico están implicadas cuatro vitaminas: riboflavina, folato, vitamina B₆ y vitamina B₁₂. La deficiencia absoluta o relativa de alguna o varias de estas vitaminas determina la elevación de los niveles de homocisteína. Diversos estudios epidemiológicos han puesto claramente de manifiesto la relación entre los niveles de homocisteína, la ingesta de estas vitaminas y la incidencia de cardiopatía isquémica. No obstante, existen aspectos que son objeto de controversia. En el presente artículo se analiza la evidencia actualmente disponible relativa a este problema y las implicaciones clínicas que tiene.

Palabras clave: Homocisteína. Folato. Cardiopatía isquémica. Suplementos vitamínicos.

Summary

Cardiovascular disease, and particularly ischemic heart disease, is the leading cause of death in developed countries. A significant reduction in cardiovascular mortality has been observed during the last decade. This is attributed to a healthier life style (nutrition, physical exercise, tobacco) and to the recent advances in the identification, early diagnosis and treatment of several risk factors (dyslipidemias, hypertension, obesity). Nevertheless, cardiovascular disease will remain as the leading cause of death during, at least, the next 20 years. In fact, only 50% of ischemic heart disease episodes and strokes can be related to classic risk factors (hypercholesterolemia, hypertension, lack of physical exercise, stress, obesity). Therefore, it is important to identify and control other risk factors that may be important contributors in the atherogenesis process. One of these factors, is the elevated plasma homocysteine levels, which is today considered an independent risk factor. Homocysteine is a non proteinogenic amino acid, essential for the methylation process and formed in the methionine cycle. Four vitamins are implicated in this cycle: riboflavin, folate, B₆ and B₁₂. The absolute or relative deficiency of one or more of these vitamins increases the plasma homocysteine levels. Several epidemiological studies have shown the relationship between plasma homocysteine levels, vitamin intake and the incidence of ischemic heart disease. Nevertheless, there are some important controversial points. In the present article, the current scientific evidence and its clinical implications are analysed.

Key words: homocysteine, folate, cardiovascular disease, supplements

Introducción:

La existencia de alteraciones en el metabolismo de la homocisteína se identificó por primera vez en 1962¹ al analizar la orina de ciertos niños con retraso mental. Se comprobó que estos niños presentaban gran cantidad de homocistina en orina, surgiendo el concepto homocistinuria. Dos años después se demostró que el problema radicaba en un déficit congénito de la enzima cistationin-beta-sintetasa, constatándose además que el proceso cursaba con niveles plasmáticos elevados de homocisteína y gran incidencia de episodios tromboembólicos. De hecho, el 50% de los niños que presentaban este cuadro fallecían antes de llegar a adultos, por enfermedad cardiovascular². En 1969 McCully³ describió la lesión anatomopatológica que presentaban estos pacientes y que incluía, entre otros cambios, proliferación de células musculares lisas, estenosis arterial y cambios hemostáticos.

Desde entonces y hasta ahora, pero en especial en la última década, han sido múltiples los esfuerzos realizados para profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo o factor asociado a la enfermedad cardiovascular. Es más, se ha constatado que no sólo los niveles muy elevados de homocisteína se asocian a patología cardiovascular sino que también, niveles moderadamente elevados pueden constituir un factor de riesgo independiente para dichas patologías. En este sentido, algunos autores establecen el rango de normalidad en las concentraciones plasmáticas de homocisteína total (tHcy) entre 5 y 15 $\mu\text{mol/l}$ ^{4,5}; otros autores cifran la normalidad en valores de hasta 10 $\mu\text{mol/l}$ ⁶. La hiperhomocisteinemia la podemos subdividir en moderada (valores de hasta 30 $\mu\text{mol/l}$), intermedia (valores de hasta 100 $\mu\text{mol/l}$) y severa (valores superiores a 100 $\mu\text{mol/l}$)⁴.

Además de la enfermedad cardiovascular, alteraciones en el metabolismo de la homocisteína se han implicado también en otras patologías. En la tabla 1 se enumeran algunas de ellas y en la tabla 2 se presentan manifestaciones clínicas que se han visto ligadas a un exceso en los niveles circulantes de homocisteína. En el presente artículo, se describe la base bioquímico-fisiológica de la hiperhomocisteinemia y se analiza, de manera específica, la relación entre hiperhomocisteinemia y patología cardiovascular.

Base bioquímica de la hiperhomocisteinemia

La homocisteína es un aminoácido sulfurado que no forma parte de las proteínas ni está presente en la dieta de manera significativa. De hecho, constituye un producto intermediario en el metabolismo de la metionina, interviniendo en las reacciones de metilación del organismo (figura 1).

Los niveles circulantes de homocisteína son el resultado del equilibrio entre su tasa de producción y su tasa de degradación metabólica. Un aumento de los niveles de homocisteína puede ocurrir por un aumento de producción o por un defecto de metabolización. Es precisamente, una disminución del catabolismo de la homocisteína el principal determinante de la hiperhomocisteinemia. En el catabolismo de la homocisteína intervienen varias enzimas y vitaminas (folato, B₆, B₁₂ y B₂). Estas últimas actúan como co-factores y/o substratos de las reacciones catabólicas de la homocisteína. Un acúmulo en los niveles de homocisteína se puede deber a un defecto congénito de algunas de esas enzimas (*hiperhomocisteinemia congénita*) o a un déficit de alguno de los cofactores (vitaminas) necesarios para la actividad de dichas enzimas (*hiperhomocisteinemia adquirida*). Como se ha indicado previamente, al no estar presente en la dieta, no cabe hablar de una hiperhomocisteinemia ligada a un exceso de aporte nutricional. No obstante, la ingesta de proteínas con alto contenido en metionina podría dar lugar en algunas personas a un aumento pasajero en los niveles de homocisteína, al ser la metionina un precursor de ésta. Hay que indicar, por último, que los niveles de homocisteína se modifican en diversas situaciones fisiológicas (edad, embarazo) y se alteran también ante modificaciones en el estilo de vida.

Metabolismo de la homocisteína

La homocisteína es el producto que se forma al ceder la S-adenosil-metionina (forma activa de la metionina) un grupo metilo. Una vez formada, la homocisteína puede ser metabolizada por dos vías diferentes: la remetilación a metionina o la degradación a cisteína en la vía de la transulfuración (figura 1). En caso de fallo de una o ambas vías, la homocisteína se acumula en exceso, pasa a homocistina y se elimina por orina (homocistinuria).

Remetilación a metionina. En la mayoría de los tejidos, la homocisteína es remetilada a metionina por medio de la metionina sintetasa (MS), cuyo cofactor es la vitamina B₁₂ (figura 1). El 5-metil-tetrahidrofolato (5-MTHF) es el sustrato de esta reacción, que por medio de la MS pasa a tetrahidrofolato (THF). El 5-MTHF proviene de la reacción que convierte el 5,10-metilen-tetrahidrofolato en metil-tetrahidrofolato. Esta otra reacción es catalizada por la metilen-tetrahidrofólico-reductasa (MTHFR), cuyo coenzima es la vitamina B₂ en su forma activa, el flavin adenin dinucleotido (FAD). De este modo, y como puede apreciarse en la figura 1, se completa el ciclo del folato.

En hígado y, en menor medida, en riñones, la enzima betaina homocisteína metil-transferasa (BHMT) es la encargada de la remetilación de la homocisteína para transformarse en metionina (figura 1). Esta segunda ruta no necesita de B₁₂ ni de folato, utilizando la betaína como dadora de grupos metilo.

Degradación a cisteína. La vía de la transulfuración supone la degradación irreversible de homocisteína a cisteína (figura 1). En esta vía están implicadas dos enzimas: la cistationina-β-sintetasa (CBS) y la cistationina-β-liasa (CBL). La vitamina B₆, en su forma activa, el piridoxal fosfato (PLP) actúa como coenzima de ambas enzimas. En caso de seguir una dieta normal, la vía de la transulfuración y la vía de la metilación están implicadas al 50% en el metabolismo de la homocisteína^{4,7}. Cuando se ingiere un exceso de metionina, la homocisteína se dirige fundamentalmente a la vía de la transulfuración. En condiciones de balance negativo, la homocisteína se dirige principalmente a la vía de la metilación, para conservar así los niveles de metionina⁸.

Hiperhomocisteinemia congénita

En el metabolismo de la homocisteína se han descrito diversos defectos genéticos, que cursan con diferentes repercusiones clínicas, que no sólo afectan a las vías de transulfuración y remetilación, sino también a la remetilación vía betaína, que es vitamin-independiente. Los defectos enzimáticos congénitos (tabla 3) que se han descrito como determinantes de hiperhomocisteinemia son los siguientes:

- a) Defecto de la CBS. Este defecto es el más grave y conduce a concentraciones mayores de 100 μmol/l, dando lugar a

homocistinuria. Se han identificado 92 mutaciones diferentes en el gen CBS. Las más frecuentes son la I278T, cuyos homocigotos responden al tratamiento con piridoxina, y la G307S, que no lo hacen⁹. La incidencia varía de unas regiones a otras. Así, en Irlanda es de 1/50.000 personas. En otros países es de 1/250.000 - 300.000, pero varía en función del grupo étnico.

- b) Polimorfismo C677T de la MTHFR. Esta mutación se describió por Kang en 1988¹⁰. Los homocigotos para este defecto expresan una variante termolábil de la enzima. La actividad enzimática está reducida comparada con la normalidad. Los niveles plasmáticos de homocisteína están ligeramente elevados (15-20 $\mu\text{mol/l}$). Afecta alrededor de un 10 - 15% de la población, y en la actualidad existen datos insuficientes sobre su relevancia clínica. Los heterocigotos, por el contrario, son frecuentes, apareciendo en el 40-45% de la población. Según el estado actual del conocimiento, la variante heterocigótica carece de relevancia clínica^{11,12}. Esto es debido a que los defectos enzimáticos de la vía de la remetilación de la homocisteína no provocan incrementos en los niveles de homocisteína en ayunas pero sí tras una sobrecarga importante de la misma. Esto es necesario tenerlo en cuenta a la hora de hacer el test de sobrecarga con metionina, que es el método empleado para identificar el defecto.
- c) Polimorfismo A1298 C de la MTHFR. Esta mutación, menos conocida hasta la fecha, se describió en 1998 por van der Put y col¹³; y da lugar a una menor actividad de la MTHFR. Tanto homocigotos como heterocigotos no presentan mayores niveles de homocisteína, pero parece haber una interacción entre esta mutación y el polimorfismo C677T antes descrito. La heterocigocidad combinada se ha observado en un estudio en el 20% de la población y sí se asocia a aumento de los niveles de homocisteína¹³.
- d) Polimorfismo A2756G de la MS. Fue descrito por Leclerc y col. en 1996¹⁴. El genotipo 2756AA se asocia con un incremento moderado, pero significativo, de los niveles de homocisteína. Este trastorno únicamente se ha descrito en casos aislados.
- e) Recientemente se ha descrito el polimorfismo A66G de la metionina sintetasa reductasa (MTRR) por Gaughan y col.¹⁵. Esta enzima es la encargada de restaurar la actividad de la MS en

determinadas circunstancias. Los homocigóticos presentan unos niveles plasmáticos más elevados de homocisteína. Por ser reciente, no se tienen datos sobre su frecuencia y relevancia clínica.

- f) Betaína homocisteína metil transferasa (BHMT). La secuenciación genómica de esta enzima es muy reciente, y se han descrito tres mutaciones para esta enzima, G199S, Q406H, Q239R, las dos últimas únicamente en heterocigotos¹⁶. En el estudio de Heil y col.¹⁶, ninguna de estas mutaciones cursó con niveles elevados de homocisteína.

Hiperhomocisteinemia adquirida

Los factores nutricionales son los principales determinantes de la hiperhomocisteinemia adquirida. Existe escasa evidencia de que la ingesta de proteínas o metionina en cantidades fisiológicas induzca modificación alguna en los niveles de homocisteína¹⁷. En cambio, la deficiencia tanto clínica como subclínica de cualquiera de las 4 vitaminas del grupo B (folato, cianocobalamina, piridoxina y riboflavina) implicadas da lugar a una alteración en el ciclo metabólico y a elevación de la homocisteína, aunque no de la misma intensidad.

Folato

El folato es la vitamina que de forma individual presenta un mayor grado de asociación inversa con los niveles de homocisteína¹⁸⁻²⁰. Además, tanto su ingesta como sus concentraciones plasmáticas y eritrocitarias, se asocian de forma inversa con el riesgo de enfermedad coronaria²¹⁻²³. Esto está suficientemente comprobado. Así, los datos más recientes confirman los publicados en estudios anteriores. En el estudio de Koehler y col.²⁰, la ingesta de folato procedente de alimentos se asoció de forma negativa a los niveles de homocisteína. En la vigésima analítica bianual de la cohorte del "Framingham Heart Study"¹⁹, se obtuvo una fuerte asociación inversa entre los niveles de tHcy y folato, siendo esta asociación más débil para las vitaminas B₁₂ y B₆. La prevalencia de niveles elevados (> 14 µmol/l) fue del 29.3%, siendo mayor en los sujetos con peor estado en folato. En este estudio, las concentraciones plasmáticas inadecuadas de una o varias de las vitaminas del grupo B contribuyeron, en un 67% de los casos, a

determinar niveles elevados de homocisteína. Asimismo, en el estudio de la cohorte del Framingham Offspring²⁴, las concentraciones de folato plasmático fueron las principales determinantes de los niveles de homocisteína. Entre los sujetos que se encontraban en los quintiles superior e inferior de nivel de folato plasmático, la diferencia en los niveles de tHcy fue del 49%.

Vitamina B₁₂

En el caso de la vitamina B₁₂, los resultados obtenidos en diferentes estudios apuntan hacia una correlación inversa con los niveles de homocisteína^{20,25,26}, si bien es más débil que la observada para el folato. De hecho, en la mayoría de estos estudios, se suele encontrar correlación con los niveles plasmáticos de esta vitamina²⁰, pero no con la ingesta²⁴. Únicamente en ancianos y en vegetarianos se han encontrado correlaciones más significativas, tal y como se indica más adelante.

Vitamina B₆

La relación entre la vitamina B₆ y la homocisteína plasmática todavía no está del todo esclarecida y necesita de estudios posteriores. No obstante, son varios los estudios que han encontrado una correlación significativa inversa entre los niveles de homocisteína y el estado en B₆, entre ellos se encuentra el estudio de Selhub y col²⁶. En cambio, está bien fundamentada en la bibliografía la relación entre la deficiencia subclínica de B₆ y patología cardiovascular²⁷, aunque no se sabe si esto es debido a la implicación directa que la B₆ tiene sobre plaquetas, tejido conectivo y trombogénesis y/o a una acción indirecta vía hiperhomocisteinemia²⁸.

Vitamina B₂

De las vitaminas implicadas en el metabolismo de la homocisteína, la vitamina B₂ ha sido la que menos atención ha recibido en estudios sobre humanos. Recientemente, Hustad y col.²⁹ han puesto de manifiesto que la riboflavina plasmática es un indicador independiente del nivel de homocisteína. Jacques y col.²⁴ han observado una asociación modesta entre la ingesta de riboflavina y los niveles de

homocisteína en casi 2000 personas pertenecientes a la cohorte del estudio "Framingham Offspring". Se necesitan más estudios para poder evaluar la utilidad de la suplementación con riboflavina en la hiperhomocisteinemia.

Niveles de homocisteína en situaciones fisiológicas específicas

Hiperhomocisteinemia y envejecimiento

Se ha observado una relación inversa entre los niveles de homocisteína y los niveles de folato, B₆ y B₁₂ en ancianos. La inadecuada nutrición de estos pacientes podría explicar los aumentos de los niveles de homocisteína con la edad, si bien las enfermedades digestivas, como la gastritis atrófica o la malabsorción intestinal, debido a la pérdida de factor intrínseco, pueden jugar también un papel interfiriendo con la absorción de vitaminas. Van Asselt³⁰ estudió 105 pacientes con edades comprendidas entre los 74 y 80 años y demostró que a pesar de que los cambios gastrointestinales eran subclínicos, un 28% de los pacientes presentaba déficit de B₁₂, bien por dieta inadecuada o por gastritis atrófica. Por otra parte, la función renal disminuye con la edad y por tanto aumentan los niveles de homocisteína, lo que se produce por la disminución del aclaramiento plasmático de la misma. Se ha observado también una correlación negativa entre la edad y la actividad de la CBS⁷.

Hiperhomocisteinemia relacionada con cambios hormonales

Los niveles de homocisteína se van incrementando después de la menopausia, aumentando los niveles de la misma tanto en ayunas como tras sobrecarga de metionina. De hecho, la homocisteína aumenta más con la edad en la mujer que en el hombre. Se ha descrito la existencia de una correlación negativa entre el estradiol y la homocisteína en mujeres postmenopáusicas³¹. Diversos estudios han demostrado que las terapias sustitutivas con estrógenos-progesterona o sólo estrógenos provocan cambios en la tasa de homocisteína, en general disminuyéndola. La disminución es mayor si la homocisteína estaba previamente muy alta³². Se ha demostrado que la suplementación vitamínica en mujeres postmenopáusicas baja los niveles de homocisteína.

Hiperhomocisteinemia ligada a cambios en el estilo de vida

Dieta vegetariana. La vitamina B₁₂ sólo se encuentra en alimentos de origen animal, por tanto en los sujetos vegetarianos, se observan niveles plasmáticos reducidos de vitamina B₁₂, tanto más cuanto más estricto es el vegetarianismo³³⁻³⁵. En diversos estudios realizados comparando vegetarianos con controles omnívoros, los primeros presentaron niveles plasmáticos de homocisteína significativamente superiores a los segundos ($p < 0.05$)^{33,34,36}. En estos estudios, los omnívoros presentaron niveles significativamente menores de folato sérico. En las dietas vegetarianas también es menor la ingesta de metionina, un aminoácido presente en mayor cantidad en los alimentos de origen animal. Como ya se ha indicado anteriormente, en condiciones de menor disponibilidad de metionina, predomina el paso de remetilación en el ciclo metabólico (figura 1), por lo que es dependiente de B₁₂ y folato. Por tanto, en el caso de los vegetarianos, la hiperhomocisteinemia es consecuencia de la deficiencia de vitamina B₁₂. Estos niveles elevados de homocisteína podrían contrarrestar los beneficios conocidos de las dietas vegetarianas en relación con la patología cardiovascular, en especial las dietas vegetarianas estrictas. Aquí también se puede constatar que resulta más beneficiosa una dieta equilibrada omnívora como la dieta mediterránea que las dietas restrictivas, que desequilibran la relación existente en el organismo entre los diversos nutrientes.

Alcohol. Un consumo moderado de alcohol se relaciona con niveles bajos de homocisteína³⁷, mientras que un consumo elevado presenta una asociación directa, aumentando los niveles. Esto puede ser debido a varios factores: un elevado consumo de alcohol puede provocar trastornos gastrointestinales, con la consiguiente menor absorción de vitaminas. Asimismo, disminuye los niveles de vitamina B₆, folato sérico y eritrocitario³⁸. También se ha observado que el alcohol inhibe la MS²⁰. En cambio, un consumo moderado de cerveza se ha asociado a una reducción de los niveles de homocisteína, debido a su contenido en vitamina B₆³⁹ y folato³⁸.

Café. El consumo de café afecta a los niveles de homocisteína. El mecanismo es desconocido. En el Hordaland Homocysteine Study, los pacientes mayores de 40 años que consumían más de 9 tazas de café al día presentaron un aumento de la homocisteína de más del 19% frente a los que no tenían ese hábito⁴⁰. En este mismo estudio el consumo de té

se asoció con niveles menores de homocisteína, probablemente debido a la presencia de cantidades moderadas de folato en el té⁴¹ que contrarrestan el efecto de la cafeína.

Tabaco. En diversos estudios se ha puesto de manifiesto la relación directa entre el tabaco y los niveles de homocisteína^{34,40}. El número de cigarrillos está directamente relacionado con los niveles de homocisteína. En el estudio de Nakazawa y col⁴², el incremento en los niveles de tHcy en las mujeres fue del 1% por cigarrillo fumado. Las causas que se han propuesto son varias. Al parecer, la nicotina provoca un incremento del catabolismo de los folatos⁴². Varios estudios han observado niveles bajos de B₆^{43,44}, B₁₂ y folato⁴⁵ en fumadores. Se habla de una posible interacción entre los componentes nitrosos encontrados en los fumadores y la MS, lo cual explicaría la hiperhomocisteinemia²⁴. Parece que la vía de la metilación está también influida por la nicotina.

Diagnóstico de la hiperhomocisteinemia

Existen diferentes métodos para la determinación de homocisteína en plasma. La medida de la tHcy, bien en suero o en plasma, representa la suma de todas las formas que aparecen “in vivo”, como son la homocisteína libre, la homocisteína unida a proteína y los productos oxidados de la misma (homocistina y cisteína-homocisteína). En pacientes con hiperhomocisteinemia, a los tres compuestos anteriores, hay que añadir la homocisteína-tiolactona. Tal y como se ha descrito anteriormente, son múltiples los factores que pueden influir en los niveles plasmáticos de homocisteína, y por tanto, los valores analíticos sólo se pueden interpretar correctamente conociendo y valorando estos otros factores^{37,46}. A menos que se especifique otra cosa los niveles de homocisteína en plasma se refieren a la homocisteína total por ser esta la que comúnmente se analiza.

Uno de los métodos de referencia para la medida de homocisteína es el desarrollado por Araki y Sato⁴⁷ mediante HPLC. Posteriormente, Schipchandler y col.⁴⁸ desarrollaron un método totalmente automatizado de inmunoanálisis de fluorescencia polarizada, a partir de un anticuerpo monoclonal que reconoce la S-adenosil-homocisteína. Para cualquiera de los métodos citados, el manejo de la muestra es de importancia crítica, ya que una manipulación incorrecta puede aumentar artificialmente los niveles de

homocisteína. La toma de muestra debe ser realizada tras un periodo de 12 horas de ayuno. Una dieta previa rica en proteínas puede aumentar de manera circunstancial los niveles de homocisteína. La determinación de la homocisteína se puede realizar tanto en plasma como en suero. En ambos casos, una vez realizada la extracción, la muestra debe ser colocada inmediatamente en baño de hielo. Si se utiliza como anticoagulante el EDTA, la muestra se puede centrifugar inmediatamente después de extraída la sangre. Una vez centrifugada la muestra y separado el plasma, éste puede permanecer a temperatura ambiente durante 3 días y congelado durante meses. Según Willens y col⁴⁹, el anticoagulante idóneo es el ácido cítrico, ya que la sangre permanece estable durante 4 a 6 horas.

La homocisteína libre es la fracción no unida a proteína. Para su determinación, una fracción del plasma anticoagulado con EDTA es inmediatamente mezclado con buffer borato hiperclórico y recentrifugado. El sobrenadante se guarda congelado a -20°C . Cuando se vaya a realizar el análisis y una vez descongelada la muestra anterior, se añade sobre ella tri-n-butil-fosfina, mezclado e incubado durante 30 minutos en la oscuridad y a 4°C ^{47,50}, los siguientes procedimientos son iguales a los descritos anteriormente para la homocisteína total.

La determinación de la homocisteína tras una sobrecarga de metionina se realiza para distinguir entre defectos que involucran a la vía de la remetilación o de la transulfuración. Asimismo también se emplea para diagnosticar a pacientes con niveles de homocisteína en el límite de la normalidad, que pueden llegar a ser susceptibles de tener riesgo de enfermedad cardiovascular⁵¹.

Indicaciones de la medida de homocisteína

No hay datos precisos de la incidencia de hiperhomocisteinemia en la población. Aquellos casos clínicos en los que está indicada la medida de la homocisteína en el laboratorio se presentan en la Tabla 4.

La hiperhomocisteinemia como factor de riesgo cardiovascular

Son múltiples los estudios epidemiológicos que han puesto de manifiesto la relación entre la hiperhomocisteinemia y la enfermedad cardiovascular. En el ya mencionado metanálisis realizado por Boushey y col.²¹, se analizaban los datos de 27 estudios realizados entre 1988 y 1994. Por cada incremento de 5 $\mu\text{mol/l}$ tHcy, el riesgo relativo (RR) de enfermedad coronaria aumentaba 1.6 (95% de intervalo de confianza, 1.4 a 1.7), estableciendo los autores que la elevación en los niveles de homocisteína se pueden considerar un factor de riesgo independiente.

Desde entonces y hasta ahora, se ha realizado un mayor número de estudios con resultados diferentes. En tres estudios prospectivos caso-control, se observó una asociación lineal entre las concentraciones de homocisteína y la patología cardiovascular⁵²⁻⁵⁴. Otros estudios han encontrado un mayor RR comparando los percentiles más elevados de homocisteína con el resto^{55,56}. En cambio, en otros estudios no se ha podido identificar esta asociación⁵⁷⁻⁶⁰.

Basándose en estos resultados contradictorios, algunos grupos de trabajo punteros en el campo de la homocisteína han puesto recientemente en duda esta teoría^{56,61}, alegando que los datos de los que se dispone apuntan más hacia una consecuencia que a una causa de aterosclerosis, sugiriendo que se trata únicamente de un marcador de riesgo de patología vascular. Aquí hay que diferenciar entre las personas sanas y las que ya padecen algún tipo de enfermedad cardiovascular. En un estudio caso-control reciente, Knekt y col.⁵⁶ durante el seguimiento al cabo de 13 años, observaron que los niveles elevados de homocisteína no constituyen un factor de riesgo en personas sin patología cardíaca manifiesta o aparente. En cambio, proponen, que en pacientes con enfermedad coronaria diagnosticada, la hiperhomocisteinemia moderada puede ser predictiva de un segundo evento. De hecho, se puede afirmar que prácticamente todos los estudios retrospectivos y la mayoría de los prospectivos han encontrado elevaciones de homocisteína de ligeras a moderadas en pacientes con aterosclerosis comparando con controles. Sin embargo otros estudios publicados recientemente, confirman la relación entre la hiperhomocisteinemia y la disfunción endotelial⁶² y/o la enfermedad cardiovascular^{63,64} en personas aparentemente sanas. Por tanto, hace falta mayor número de estudios prospectivos para demostrar de

manera inequívoca la existencia de una relación causal entre hiperhomocisteinemia y enfermedad cardiovascular.

Contrastando con aquellos autores que ponen en duda el papel de la homocisteína, Vollset y col.⁶⁵, en un estudio prospectivo de 4766 personas con edades comprendidas entre los 65 y 67 años, observaron un aumento de la mortalidad total asociado a niveles elevados de homocisteína, aportando una nueva perspectiva en el papel de la homocisteína cual sería su implicación no sólo en la enfermedad cardiovascular sino también en otras patologías que directa o indirectamente contribuyen a aumentar la mortalidad. Esto se escapa del ámbito del presente trabajo y será objeto de revisión posterior.

Fisiopatología de la lesión vascular ligada a la hiperhomocisteinemia

El mecanismo fisiopatológico por el que la hiperhomocisteinemia condiciona la lesión cardiovascular no está del todo esclarecido. La evidencia indica que interactúa directa y/o indirectamente sobre el proceso aterogénico, contribuyendo por una parte a la disfunción endotelial y por otra facilitando la trombogénesis. Varios son los mecanismos por los que puede ocurrir esta interacción.

Homocisteína y stress oxidativo

Se sabe que la homocisteína se autooxida rápidamente, formándose homocistina, homocisteína tiolactona y mezcla de disulfuros. Durante el proceso de autooxidación se forma superóxido y peróxido de hidrógeno que, como se ha comprobado in vitro, actúan lesionando las membranas de las células endoteliales^{66,67}, iniciado la peroxidación lipídica y la oxidación del LDL-colesterol. Asimismo, Harker y col.⁶⁸ le confieren al peróxido de hidrógeno una acción de aumento de proliferación de células musculares que activan las plaquetas y los leucocitos.

Homocisteína y trombogénesis

La acumulación de homocisteína altera el mecanismo antitrombótico del endotelio, ya que aumenta la actividad del Factor XII⁶⁹ y del factor V⁷⁰, y disminuye la actividad de la proteína C⁷¹. También inhibe la trombomodulina⁷², dando lugar al aumento del factor tisular⁷³ y suprimiendo la expresión del heparinín-sulfato⁷⁴ por el

endotelio vascular. Todos estos efectos favorecen la formación de trombina y crean un medio pretrombógeno (Tabla 4).

Homocisteína y óxido nítrico

La identificación del óxido nítrico (ON) como el factor relajante del endotelio⁷⁵, por lo cual Furchgott, Ignarro y Murad obtuvieron el Premio Nobel de Medicina en 1998, le ha conferido una nueva dimensión al estudio del proceso aterosclerótico. La menor presencia de ON está considerada como un marcador temprano de la patología cardiovascular y los avances en la investigación ponen de manifiesto que la mayoría de los factores de riesgo están asociados a ella. De hecho, Tawakol y col.¹⁸ en un estudio realizado in vivo observaron que la vasodilatación endotelial mediada por el ON estaba significativamente reducida en los casos de hiperhomocisteinemia de ateroscleróticos frente a controles. Como posible mecanismo proponen que la homocisteína disminuye la biodisponibilidad del ON, bien reduciendo su síntesis o aumentando su degradación. Recientemente, Chao y col.⁷⁶ han confirmado que la disfunción endotelial causada por la hiperhomocisteinemia va ligada a una menor actividad del ON y llegan incluso a cuestionar la hipótesis de la vía del mecanismo del stress oxidativo. Upchurch y col.⁷⁷ en un estudio in vitro observaron una reducción dosis-dependiente de ON, sugiriendo que la homocisteína reduce su biodisponibilidad al reducir la actividad de la glutatión peroxidasa, no pudiendo la célula inactivar el H₂O₂ y aumentando por tanto la susceptibilidad del ON frente a la inactivación oxidativa. Esto enlaza con la hipótesis expresada recientemente por algunos autores, que consideran que el papel de la homocisteína es el de potenciar otros factores de riesgo que participan en la etiología de la aterosclerosis⁷⁸.

Tratamiento de la hiperhomocisteinemia

La suplementación con las vitaminas implicadas en el metabolismo de la homocisteína se ha demostrado eficaz en la reducción de sus niveles plasmáticos. En sujetos omnívoros, la vitamina que, ingerida de manera aislada, resulta más eficaz en reducir los niveles de homocisteína es el folato. No obstante, la combinación de folato, B₁₂ y B₆ resulta más efectiva⁷⁹. Tanto en estudios in vivo^{80,81} como in vitro^{81,82}, la suplementación con ácido fólico mejoró la función

endotelial, probablemente mejorando la biodisponibilidad del ON. La suplementación con vitamina B₁₂ redujo significativamente los niveles plasmáticos de homocisteína (12.4 ± 4.7 a 7.9 ± 3.1 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0.001$) en vegetarianos³⁶. Según estos autores, hay que seguir investigando si esta suplementación mejora la menor morbi-mortalidad cardiovascular asociada a las dietas vegetarianas.

Hay que tener en cuenta, que en las personas mayores con gastritis atrófica, se consigue una mayor reducción de los niveles de tHcy con la suplementación de vitamina B₁₂.

En la actualidad hay diversos estudios de intervención en marcha (SEARCH, WACS, CHAOS II, NORVIT, VITATOPS, VISP), con el fin de investigar si la suplementación con fólico, B₆ y B₁₂ no reduce únicamente los niveles plasmáticos de tHcy, sino también la frecuencia de enfermedades ateroscleróticas. Algunos de estos estudios pueden tener menor significancia de la esperada debido al enriquecimiento obligatorio de harinas y cereales que desde el 1 de enero de 1998 se viene realizando en EEUU y Canadá, tal y como expresan algunos autores^{83,84}.

Prevención de la hiperhomocisteinemia

La prevención de la hiperhomocisteinemia va ligada al mantenimiento de un óptimo estado vitamínico. Este se puede conseguir adoptando las siguientes medidas:

a) *Mayor ingesta de alimentos ricos en folato*, como verduras de hoja verde, plátanos, mangos, pistachos. No se debe olvidar la labilidad de la vitamina que requiere un almacenamiento, cocinado y mantenimiento correcto de los alimentos, ya que se puede perder hasta el 100% de su contenido⁸⁵.

b) *Enriquecimiento de alimentos*. Como ya se ha indicado, desde el 1 de enero de 1998, en EEUU se enriquecen los cereales y derivados con 140 μg de ácido fólico/100 g. Los primeros datos publicados al respecto, indican que con esta medida se incrementan los niveles de folato en un 30%, pero que sólo se reducen los de homocisteína en un 3 a 7%. En cambio, los cereales enriquecidos con 400 μg de ácido fólico/100 g reducen los niveles de homocisteína en un 11%⁸⁶. Esto sugiere que el enriquecimiento con mayores niveles puede ser recomendado como óptimo. En la cohorte del Framingham Offspring estudiada

recientemente por Jacques y col.²⁴ después del enriquecimiento obligatorio citado, se ha observado una reducción significativa ($p < 0.001$) de la prevalencia de niveles elevados de homocisteína, disminuyendo éstos a la mitad.

c) *Suplementación vitamínica.* Diversos estudios han puesto de manifiesto, que las personas que consumen regularmente suplementos de vitaminas del grupo B presentan menores concentraciones de homocisteína que las personas que no consumen ningún suplemento²⁴. Prestigiosos investigadores⁸⁷ han propuesto que debido a la elevada prevalencia (al menos un tercio) de deficiencia vitamínica en las personas mayores, este grupo de población debería suplementarse de rutina. Por tanto, en relación con esta patología que comparte factores de riesgo con los accidentes cerebrovasculares, también hay que considerar la oportunidad de esta medida. Un potencial riesgo de la suplementación sólo con ácido fólico es el daño neurológico progresivo en pacientes con déficits subclínicos de B₁₂, donde el tratamiento con ácido fólico puede enmascarar el desarrollo de las manifestaciones hematológicas de la misma. Una de las líneas de investigación actualmente en desarrollo por parte de nuestro grupo trata, precisamente, de dilucidar esta problemática.

Conclusiones

La investigación en torno a la implicación de la homocisteína en la etiología de la enfermedad cardiovascular atraviesa un momento importante ya que, a pesar de las numerosas evidencias epidemiológicas que apuntan en este sentido, no se ha podido demostrar hasta la fecha una relación inequívoca de causalidad mediante estudios de intervención bien controlados. Igualmente, es necesario profundizar en el estudio de los mecanismos mediante los cuales la hiperhomocisteinemia contribuye a la disfunción endotelial. No obstante, los datos de los que se dispone actualmente parecen indicar que los niveles elevados de homocisteína son algo más que un marcador de la enfermedad cardiovascular estando *per se* implicados, de alguna forma, en el desarrollo del proceso aterogénico. Se sabe que niveles elevados de homocisteína se producen como consecuencia de déficits subclínicos de las diversas vitaminas que intervienen en su metabolismo (folato, vitamina B₁₂ y vitamina B₆). La administración de estas vitaminas consigue reducir la hiperhomocisteinemia. Debido al

progresivo envejecimiento de la población en los países occidentales y a la elevada prevalencia de deficiencias subclínicas de vitaminas en la población anciana, parece indicado suplementar de rutina a este grupo de población. No obstante, habrá que esperar los resultados de los estudios prospectivos de intervención actualmente en curso, tanto en Europa como en EEUU y Canadá, para poder adoptar medidas basadas en una sólida evidencia.

Bibliografía

- 1.-Gerritsenn T, Vaughan JG, Waisman HA. The identification of homocysteine in the urine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1962;9:493-496.
- 2.-Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L. Homocystinuria: an enzymatic defect. *Science* 1964;143:1443-1445.
- 3.-Mc Cully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56:111-28.
- 4.-Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Ann Rev Nutr* 1992;12:279-98.
- 5.-Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, Ji J, Otto JM, Taylor LM Jr. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem*. 1994 Jun;40(6):873-81.
- 6.-Pietrzik K, Brönstrup A. Folate in preventive medicine: a new role in cardiovascular disease, neural tube defects, and cancer. *Ann Nutr Metab* 1997;41:331-343.
- 7.-Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, Andria G, Boers GHJ, Bromberg IL, Cerone R, Fowler B, Gröbe H, Schmidt H, Schweitzer L. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985;37:1-31.
- 8.-Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1:228-37.
- 9.-Kraus JP, Janosik M, Kozich V, y col. Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. *Hum Mutat* 1999;13(5):362-375.
- 10.-Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988;43:414-421.
- 11.-Blom HJ, Kleinvelde HA, Boers GH, et al. Lipid peroxidation and susceptibility of low density lipoprotein to in vitro oxidation in hiperhomocysteinemia. *Eur J Clin Invest* 1995;25:149-54.
- 12.-Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *New Engl J Med* 1998;338:1042-1050.

- 13.-Van der Put NMJ, Gabreëls F, Stevens EMB, Smeitink JAM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylentetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects?. *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-1051.
- 14.-Leclerc D, Campeau E, Goyette P, y col. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 1996;5(12):1867-74.
- 15.-Gaughan DJ, Kluijtmans LAJ, Barbaux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JWG, Evans A, Whitehead AS. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 2001;157:451-456.
- 16.-Heil SG, Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Trijbels FJ, Blom HJ. Betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT): genomic sequencing and relevance to hyperhomocysteinemia and vascular disease in humans. *Mol Genet Metab* 2000;71(3):511-9.
- 17.-Guttormsen AB, Solheim E, Ueland PM and Refsum H. Quantitation of total homocysteine, total cysteine and cystathionine in human plasma and serum by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Neth J Med* 1998;52:539-540.
- 18.-Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 1997;95:1119-1121.
- 19.-Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. Relationship between plasma homocysteine and vitamin status in the Framingham study population. Impact of folic acid fortification. *Public Health Rev* 2000;28(1-4):117-45.
- 20.-Koehler KM, Baumgartner RN, Garry PJ, Allen RH, Stabler SP, Rimm EB. Association of folate intake and serum homocysteine in elderly persons according to vitamin supplementation and alcohol use. *Am J Clin Nutr* 2001;73:628-637.
- 21.-Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease. *JAMA* 1995;274:1049-1057.

- 22.-Morrison HI, Schaubel D, Desmeules M, Wigle DT. Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. *JAMA*. 1996;275(24):1893-6.
- 23.-Verhoef P, Stampfer MJ, Rimm EB. Folate and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 1998;9(1):17-22.
- 24.-Jacques PF, Bostom AG, Wilson PWF, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 2001;73:613-621.
- 25.-Israelsson B, Brattstrom LE, Hultberg BL. Homocysteine and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1988;71:227-233.
- 26.-Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270:2693-8.
- 27.-Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE, Gaziano JM, Allen RH, Stabler SP, Reynolds RD, Kok FJ, Hennekens CH, Willet WC. Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction – relation with vitamin B6, vitamin B¹², and folate. *Am J Epidemiol* 1996;143:845-859.
- 28.-McKinley MC. Nutritional aspects and possible pathological mechanisms of hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *Proc Nutr Soc* 2000;59:221-237.
- 29.-Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjorke-Monsen AL, Schneede J. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clinical Chem* 2000;46:1065-1071.
- 30.-Van Asselt DZ, de Groot LC, van Staveren WA, Blom HJ, Wevers RA, Biemond I, Hoefnagels WH. Role of cobalamin intake and atrophic gastritis in mild cobalamin deficiency in older Dutch subjects. *Am J Clin Nutr* 1998;68(2):328-34.
- 31.-Ventura P, Cagnacci A, Malmusi S, Panini R, Baldassari F, Arangino S, Volpe A, Salvioli G. Continuous combined hormone replacement therapy with oral 17beta-estradiol and norethisterone acetate improves homocysteine metabolism in postmenopausal women. *Menopause* 2001;8(4):252-8.
- 32.-Morris MS, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH. Total homocysteine and estrogen status indicators in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 2000;152(2):140-8.

- 33.-Mann NJ, Li D, Sinclair AJ, et al. The effect of diet on plasma homocysteine concentrations in healthy male subjects. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53(11):895-9.
- 34.-Krajcovicova-Kudlackova M, Blazicek P, Kopcova J, Bederova A, Babinska K. Homocysteine levels in vegetarians versus omnivores. *Ann Nutr Metab* 2000;44(3):135-8.
- 35.-Refsum H, Yajnik CS, Gadkari M, Schneede J, Vollset SE, Orning L, Guttormsen AB, Joglekar A, Sayyad MG, Ulvik A, Ueland PM. Hyperhomocysteinemia and elevated methylmalonic acid indicate a high prevalence of cobalamin deficiency in Asian Indians. *Am J Clin Nutr* 2001;74(2):233-41.
- 36.-Mezzano D, Munoz X, Martinez C, et al. Vegetarians and cardiovascular risk factors: hemostasis, inflammatory markers and plasma homocysteine. *Thromb Haemost* 1999;81(6):913-7.
- 37.-Halsted CH. Lifestyle effects on homocysteine and an alcohol paradox. *Am J Clin Nutr* 2001;73:501-2.
- 38.-Cravo ML, Gloria LM, Selhub J, Nadeau MR, Camilo ME, Resende MP, Cardoso JN, Leitao CN, Mira FC. Hiperhomocisteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B₁₂ and vitamin B₆ status. *Am J Clin Nutr* 1996;63:220-224.
- 39.-van der Gag MS, Ubbink JB, Sillanaukee P, Nikkari S, Hendriks HF. 2000Effect of consumption of red wine, spirits, and beer on serum homocysteine. *Lancet*. 2000;355(9214):1522.
- 40.-Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997;337:230-236.
- 41.-Chen TS, Lui CKF, Smith CH. Folacin content of tea. *J Am Diet Assoc* 1983;82:627-32.
- 42.-Nakazawa Y, Chiba K, Imatoh N, Kotorii T, Sakamoto T, Ishizaki T. Serum folic acid levels and antipyrine clearance rates in smokers and non-smokers. *Drug Alcohol Depend* 1983;11:201-207.
- 43.-Ubbink JB, van der Merwc A, Delpoort A, et al. The effect of subnormal B₆ status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest* 1996;98:177-84.

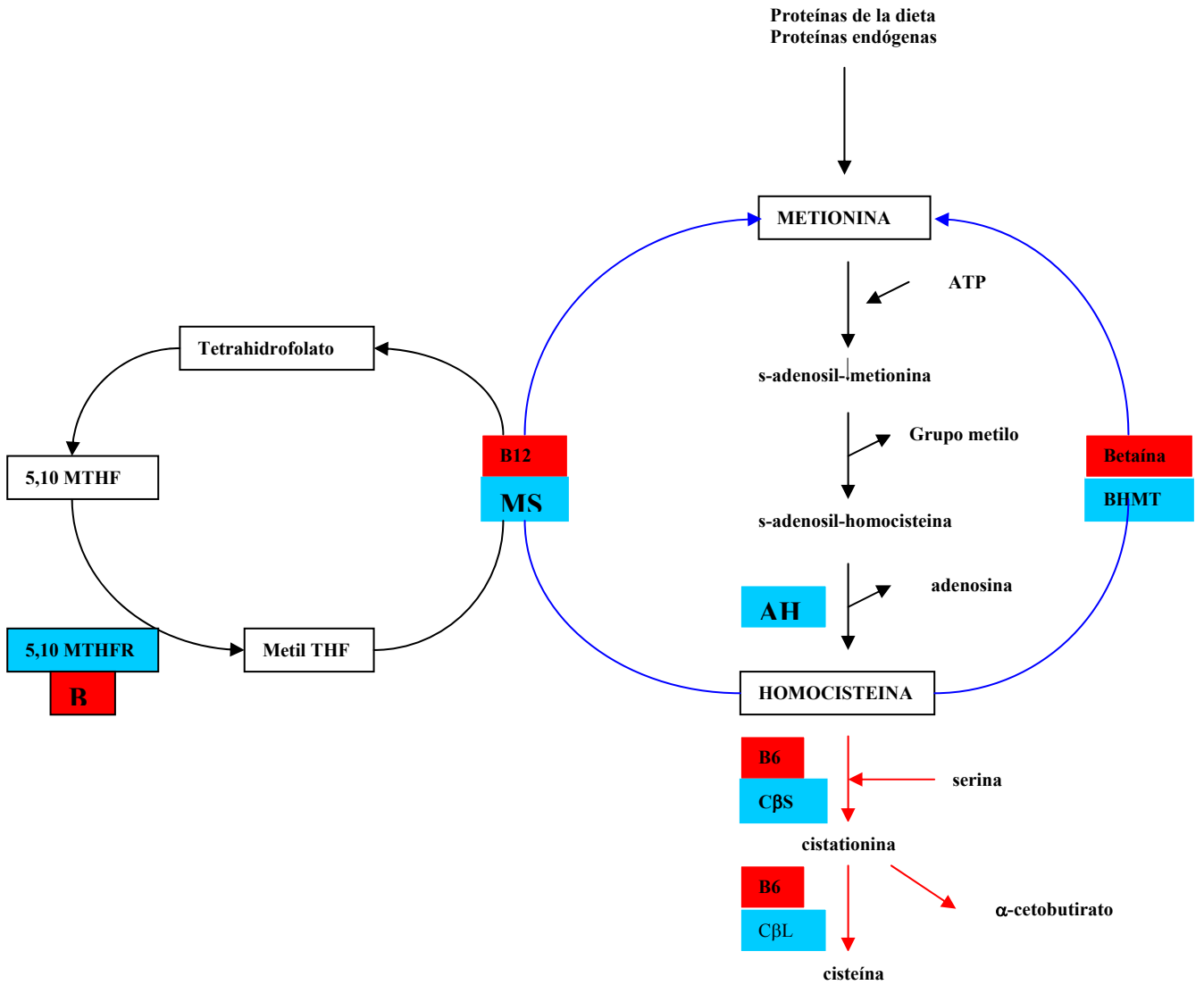
- 44.-Vermaak WJ, Ubbink JB, Barnard HC, Potgieter GM, Jaarsveld H, Groenewald AJ. Vitamin B₆ nutrition status and cigarette smoking. *Am J Clin Nutr* 1990;51:1058-61.
- 45.-Ortega RM, Marzana I, Gonzalez-Gross M, Redondo R, López-Sobaler A, Andrés P, Zamora MJ. Influence of Smoking on Folate Intake and Blood Folate Concentrations in a Group of Elderly Spanish Men. *Am Coll Nutr* 1994,13(1):68-72.
- 46.-Vollset SE, Refsum H, Ueland PM. Population determinants of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 2001a;73:499-500.
- 47.-Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987;422:43-52.
- 48.-Shipchandler MT, Moore EG. Rapid, fully automated measurement of plasma homocysteine with the Abbot Imx analyzer. *Clin Chem* 1995;41:991-4.
- 49.-Willens HP, Bos GM, Gerrits WB, den Heijer M, Vloet S, Blom HJ. Acidic citrate stabilizes blood samples for assay of total homocysteine. *Clin Chem* 1998;44:342-5.
- 50.-Vester B, Rasmussen K. High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. *Eur J Clin Chem. Clin Biochem* 1991;29:549-554.
- 51.-Bolander-Gouaille C. Focus on homocysteine. Springer-Verlag France. Paris. 2001.
- 52.-Arnesen E, Refsum H, Bonna KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995;24:704-9.
- 53.-Wald NJ, Watt HC, Law MR, Weir DG, McPartlin J, Scott JM. Homocysteine and ischemic heart disease: results of a prospective study with implications regarding prevention. *Arch Intern Med* 1998;158:862-867.
- 54.-Bots ML, Launer LJ, Lindemans J, Hoes AW, Hofman A, Witteman JCM, Koudstaal PJ, Grobbee DE. Homocysteine and short-term risk of myocardial infarction and stroke in the elderly. *Arch Intern Med* 1999;159:38-44.

- 55.-Whincup PH, Refsum H, Perry IJ, Morris R, Walker M, Lennon L, Thomson A, Ueland PM, Ebrahim SB. Serum total homocysteine and coronary heart disease: prospective study in middle aged men. *Heart*. 1999;82(4):448-54.
- 56.-Knet P, Reunanen A, Alfthan G, Heliövaara M, Rissanen H, Marniemi J, Aromaa A. Hyperhomocysteinemia: a risk factor or a consequence of coronary heart disease? *Arch Intern Med* 2001;161(13):1589-94.
- 57.-Folsom AR, Nieto J, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt JH, Hess DL, Davis CE. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Circulation* 1998;98:204-210.
- 58.-Evans RW, Shaten J, Hempel JD, Cutler JA, Kuller LH. Homocysteine and risk of cardiovascular disease in the multiple risk factor intervention trial. *Arteriol Thromb Vasc Biol* 1997;17:1947-1953.
- 59.-Ubbink JB, Fehily AM, Pickering J, Elwood PC, Vermaak WJ. Homocysteine and ischaemic heart disease in the Caerphilly cohort. *Atherosclerosis* 1998;140(2):349-56.
- 60.-Fallon UB, Ben-Shlomo Y, Elwood P, Ubbink JB, Davey Smith G. Homocysteine and coronary heart disease in the Caerphilly cohort: a 10 year follow up. *Heart* 2001; 85:153-158.
- 61.-Brattstrom L, Wilcken DE. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am J Clin Nutr* 2000;72(2):315-23.
- 62.-Mujumdar VS, Hayden MR, Tyagi SC. Homocyst(e)ine induces calcium second messenger in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 2000 Apr;183(1):28-36.
- 63.-Voutilainen S, Alfthan G, Nyyssonen K, Salonen R, Salonen JT. Association between elevated plasma total homocysteine and increased common carotid artery wall thickness. *Ann Med* 1998;30:300-306.
- 64.-Aronow WS, Ahn C. Increased plasma homocysteine is an independent predictor of new coronary events in older persons. *Am J Cardiol* 2000;86:346-347.

- 65.-Vollset SE, Refsum H, Tverdal A, Nygard O, Nordrehaug JE, Tell GS, Ueland PM. Plasma total homocysteine and cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Hordaland Study. *Am J Clin Nutr* 2001b;74(1): 130-136.
- 66.-Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res* 1980;18:113-121.
- 67.-Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986;77:1370-6.
- 68.-Harker LA, Slicner SJ, Scott CR, Ross R. Homocysteine: vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med* 1974;291:537-43.
- 69.-Ratnoff OD. Activation of Hageman factor by L-homocysteine, *Science* 1968;162:1007-9.
- 70.-Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocysteine induced vascular endothelial cell activator: *J Clin Invest* 1986;77:1909-16.
- 71.-Rodgers GM, Conn MT. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 1990;75:895-901.
- 72.-Lentz SR, Sadler JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 1991;88:1906-14.
- 73.-Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1327-33.
- 74.-Nissinaga 1993 Nishinaga M, Ozawa T, Shintada K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;92:1381-6.
- 75.-Chao CL, Kuo TL, Lee YT. Effects of methionine-induced hyperhomocysteinemia on endothelium-dependent vasodilation and oxidative status in healthy adults. *Circulation* 2000;101(5):485-90.

- 76.-Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, et al. Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997;272:17012-7.
- 77.-Ueland PM, Refsum H, Beresford SAA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000;72:324-32.
- 78.-Brönstrup A, Hages M, Pietrzik K. Lowering of homocysteine concentrations in elderly men and women. *Int J Vitam Nutr Res* 1999;69(3):187-193.
- 79.-Title LM, Cummings PM, Giddens K, Genest JJ Jr, Nassar BA. Effect of folic acid and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(3):758-65.
- 80.-Verhaar MC, Wever RMF, Kastelein JJP, van Dam T, Koomans HA, Rabelink TJ. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;97:237-241.
- 81.-Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279(4):F671-8.
- 82.-Bostom AG, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH. Power shortage: clinical trials testing the "homocysteine hypothesis" against a background of folic acid-fortified cereal grain flour. *Ann Intern Med* 2001;135(2):133-7.
- 83.-Blacher J, Safar ME. Homocysteine, folic acid, B vitamins and cardiovascular risk. *J Nutr Health Aging* 2001;5(3):196-199.
- 84.-Bässler KH, Golly I, Loew K, Pietrzik K. *Vitamin-Lexikon*. Frankfurt-Main: Govi Verlag, 1997.
- 85.-Malinow MR, Duell PB, Hess DL, Anderson PH, Kruger WD, Phillipson BE, Gluckman RA, Block PC, Upson BM. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* 1998;338(15):1009-1015.
- 86.-Chandra RK. Nutrition and immunity in the elderly. *Nutr Rev* 1992;50(12):367-71.

Figura 1. Metabolismo de la homocisteína



→ Vía de la transulfuración

Metiltransferasa

Reductasa

→ Vía de la remetilación

- CβS. Cistationina Beta Sintetasa
- MS. Metionina Sintetasa
- BHMT. Betaína Homocisteína
- 5,10 MTHFR 5,10 Metil Tetrahidrofolato
- Metil THF Metil Tetrahidrofolato
- 5,10 MTHF 5,10 Metilentetrahidrofolato
- AH Adenosil Homocisteinasa
- CβL Cistationina Beta Liasa

Tabla 1. Patologías ligadas a hiperhomocisteinemia

Enfermedad gastrointestinal: Gastrectomizados, resecciones intestinales Gastritis atrófica
Enteropatía inducida por gluten
Enfermedad de Crohn
Nutrición Inadecuada: Vegetarianos estrictos
Ovolactovegetarianos
Enfermedades autoinmunes: Artritis reumatoide
Lupus eritematoso
Diabetes Hipotiroidismo Psoriasis
Insuficiencia renal Enfermedades cardiovasculares

Tabla 2. Manifestaciones clínicas que pueden estar ligadas a hiperhomocisteinemia

Astenia
Pérdida de peso
Síntomas neurológicos y psiquiátricos:
Vértigos
Pérdida de memoria
Parestesias de miembros
Ataxia
Disminución de reflejos
Confusión
Irritabilidad
Dificultad de concentración
Disminución de la memoria
Demencia
Depresión
Síndrome de fatiga crónica
Fibromialgia
Astenia
Pérdida de peso
Síntomas de anemia
Apatía
Disnea de esfuerzo
Cansancio
Luxación del cristalino
Reacciones adversas a la anestesia: óxido nitroso
Trombosis espontánea
Complicaciones en embarazos

Tabla 3. Hiperhomocisteinemia congénita

ALTERACIÓN ENZIMÁTICA	REACCIÓN ENZIMÁTICA AFECTADA	ALTERACIÓN ANALÍTICA
CβS	Homocisteína→Cistationina	↑ Homocisteína ↑ Metionina
MTHFR	Metilen THF→Metil THF	↑ Homocisteína ↑ Metionina ↓ Folato
MTHFR Termolábil	Metilen THF→Metil THF	↑ Homocisteína ↓ Folato
Factor Intrínseco	Absorción de B ₁₂	↑ Homocisteína ↓ B ₁₂
Transcobalamina II	Transporte de B ₁₂	↑ Homocisteína ↓ Folato
Cb1 C y D	Cb1(II) →Cb1(III)	↓ B ₁₂ ↑ Homocisteína ↓ Folato
Cb1 F	Salida de Cb1 de los lisosomas	
Cb1 E y G	Homocisteína →Metionina	↑ Homocisteína

Tabla 4. Indicaciones para la analítica de la homocisteína plasmática

FACTORES GENÉTICOS	Homocisteína*
Homocigotos para la CBS	↑↑↑
Heterocigotos para la CBS	↑
Homocigotos para la MTHFR	↑↑↑
Heterocigotos para la MTHFR	↑
Mutaciones C, D, E, F y G de la Cobalamina	↑↑↑
MTHFR Termolábil	↑
FACTORES FISIOLÓGICOS	
Edad	↑
Sexo. Mujeres postmenopáusicas	↑
Disminución de la función renal	↑
Obesidad	↑
ESTILO DE VIDA	
Tabaco	↑
Café	↑
Alcohol	↑
FACTORES CLÍNICOS	
Déficit de folatos	↑↑
Déficit de B ₁₂	↑↑↑
Déficit de B ₆	↑
Fallo renal	↑↑
Síndromes linfoproliferativos	↑
Hipotiroidismo	↑
Enfermedad cardiovascular	↑↑
INGESTA DE MEDICAMENTOS	
<i>Antagonistas del folato:</i>	↑
Metotrexato	
Fenotiazinas	
Antidepresivos tricíclicos	
Anticonceptivos orales	
Tuberculostáticos	
Trimetropin	
Antiepilépticos: (Fenitona, fenobarbital, primidona, carbamazepina, ácido valproico)	
<i>Antagonistas de la B₁₂:</i>	↑↑
Oxido nitroso	
<i>Antagonistas de la B₆:</i>	↑
Azarabina	
Isoniazida	
Cicloserina	
Carbamazepina	
Teofilina	

*↑ Aumento leve ↑↑ Moderado y ↑↑↑ grave de homocisteína,

CBS= Cistationina-beta-sintetasa

MTHFR= Mutilen-tetrahidrofolato reductasa

EL FOLATO

EL FOLATO: UNA VITAMINA EN CONSTANTE EVOLUCIÓN

Marcela González-Gross ^{1,2,4}, Ricardo Sola ³, Manuel J. Castillo ⁴

mggross@canal21.com

¹ Institut fuer Ernaehrungswissenschaft. Abt. Pathophysiologie der Ernährung. Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität. D-53115 Bonn. Alemania.

² Instituto de Nutrición y Bromatología. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). E-28040 Madrid. España.

³ Servicio de Hematología. Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada. España.

⁴ Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada E-18071 Granada. España.

Agradecimientos: Los autores agradecemos al Prof. Klaus Pietrzik su generosa ayuda en la preparación del manuscrito.

Dirección para la correspondencia:

Dra. Marcela González-Gross
Instituto de Nutrición y Bromatología
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Edificio Instituto del Frío
C/ Ramiro de Maeztu, s/n
E-28040 Madrid
Tel: +34 91 549 00 38
Fax: +34 91 549 50 79
Email: mggross@canal21.com

Introducción:

La publicación de las nuevas ingestas recomendadas de energía y nutrientes para la población de EEUU y Canadá, englobadas en el nuevo concepto de *Dietary Reference Intakes* (DRI)¹, ha dado lugar a uno de los movimientos científicos más importantes de los últimos años en materia de nutrición. Por primera vez, estas recomendaciones no se han planteado únicamente con el fin de cubrir las necesidades de la población y evitar las carencias clínicamente evidentes, sino que se ha evaluado para cada nutriente el posible potencial de beneficio que una determinada ingesta puede suponer para la salud. En el caso del folato, una vitamina hidrosoluble englobada dentro del grupo de vitaminas B, las investigaciones realizadas en los últimos años en distintos países, han llevado (tabla 1) a duplicar las ingestas recomendadas para los adultos, pasando de 200 a 400 µg/día¹. A la espera de actualizar las ingestas recomendadas de energía y nutrientes para la población española^{2,3}, parece oportuno revisar las novedades que se han producido recientemente en torno a esta vitamina.

Folato, folatos y ácido fólico

En las nuevas DRI¹ se diferencian por primera vez de forma explícita los términos folato (*folate*), folatos alimentarios (*food folate*) y ácido fólico (*folic acid*), con el fin de aclarar conceptos y evitar diferentes interpretaciones. El *folato* se propone como término genérico para esta vitamina hidrosoluble, que comprende un grupo de compuestos de estructura química similar. Estos diferentes folatos pueden estar presentes en concentración variable en los alimentos (*folatos alimentarios*). El *ácido fólico* (ácido pteroilmonoglutámico, PGA) es la forma sintética farmacéutica de la vitamina, y es la forma que se encuentra en los suplementos vitamínicos y se emplea en el enriquecimiento de alimentos.

La molécula de ácido fólico se compone de un anillo de pteridina unida por la mitad por medio de un puente de metileno a un ácido p-aminobenzoico (fig. 1). Al extremo carboxilo de este radical ácido se pueden unir de uno a siete restos de glutamato⁴. Si el compuesto posee más de dos restos glutamato, se trata de un poliglutamato, si solo posee uno se habla de monoglutamato. En los alimentos se encuentran los folatos preferentemente en forma de poliglutamatos. También como mezcla de mono y poliglutamatos, siendo mayor la biodisponibilidad

de los primeros. Además, los folatos naturales presentan diferentes grados de hidrogenación del anillo de pteridina (por ejemplo, dehidro y tetrahidrofolato). A esto hay que añadir que los átomos de nitrógeno N-5 y N-10 pueden captar unidades de átomos de carbono (por ejemplo, restos metilo, metileno, formilo y formimino). En consecuencia, el término folatos engloba una amplia variedad de compuestos emparentados.

La biodisponibilidad media de los folatos alimentarios se encuentra en torno al 50%, debido a la necesaria conversión a monoglutamatos previa a su absorción. La del ácido fólico, en cambio, es casi del 100%. Con el fin de establecer la biodisponibilidad real de los diversos compuestos, se ha definido el término de “equivalente dietético de folato” (*Dietary folate equivalent*, DFE)¹. El National Institute of Health (NIH) americano establece, además, una diferencia entre la biodisponibilidad del folato según que se esté o no en ayunas¹. Por ser el ayuno un factor que determina una pequeña influencia (en torno al 10%), las Sociedades de Nutrición de Alemania, Austria y Suiza proponen en sus ingestas recomendadas conjuntas⁵ no establecer esta diferencia. En base a lo anterior, parece razonable adoptar los siguientes DFE:

$$1 \mu\text{g DFE} = 1 \mu\text{g folato alimentario} = 0.5 \mu\text{g ácido fólico (PGA)}$$

Los alimentos ricos en folato se citan en la tabla 2. Algunos estudios han puesto de manifiesto que las proteínas de la leche – que tienen la capacidad de combinarse con el folato – aceleran en gran medida la absorción de la vitamina⁶.

Fisiología del folato en el organismo

Los *folatos* de los alimentos, antes de ser absorbidos, son hidrolizados de poliglutamatos a monoglutamatos por medio de una conjugasa intestinal, la γ -glutamil-carboxi-peptidasa. El transporte activo de los monoglutamatos a través de las células de la mucosa intestinal a nivel del yeyuno proximal es pH-dependiente y sigue una cinética de saturación, viéndose estimulado por la presencia de glucosa y Na^+ con las que se absorbe mediante un mecanismo de co-transporte⁷. Alrededor de un 20-30% del folato se absorbe mediante difusión pasiva (mecanismo no saturable), siendo ésta la vía que actúa preferentemente cuando se administran dosis farmacológicas de la vitamina. En sangre, se encuentra preferentemente en forma de 5-metil-tetrahidrofolato (5-

MTHF), que se une de forma inespecífica a albúmina, alfa-macroglobulina y transferrina.

Antes de ser depositados en los tejidos, los monoglutamatos se conjugan a poliglutamatos por medio de la enzima folilpoliglutamato-sintetasa. Estos poliglutamatos, o bien se almacenan intracelularmente (en mayor proporción en hígado), o pasan a ácido 5,6,7,8 - tetrahidrofólico (THF), que es la forma activa coenzimática. La homeostasis del folato viene regulada por un ciclo entero-hepático. El adulto sano posee alrededor de 22 mg de folato. La eliminación urinaria es del 10 al 20% del folato absorbido, la eliminación vía fecal es despreciable⁷⁻⁹.

Bioquímica del folato en la célula

El THF funciona como transportador intermediario de unidades de un carbono (C₁) en cierto número de reacciones enzimáticas, captando los grupos hidroximetilo, metileno y formilo y volviéndolos a ceder. Los distintos compuestos THF-C₁ se diferencian por su grado de oxidación. Participan en la síntesis del DNA y en el metabolismo de los aminoácidos. En este último caso, su participación en el ciclo metabólico de la metionina le confiere un papel importante en el funcionamiento del sistema nervioso, ya que la S-adenosil-metionina (SAM), la forma activa de la metionina, es el principal dador de grupos metilo para la síntesis de la colina (fig. 2). Para el óptimo funcionamiento de este ciclo metabólico, la homocisteína (tHcy), que es un producto intermedio, capta el grupo metilo del folato para pasar de nuevo a metionina (fig. 2). En la síntesis del DNA, el folato participa en varios pasos. En la síntesis de pirimidinas, el 5,10-metilen-THF metila el d-urilato a timidilato. En la síntesis de purinas, el 10-formil-THF cede dos átomos de carbono en las posiciones C₂ y C₈ a la estructura anular. El folato, además, participa en el catabolismo de histidina a ácido glutámico y en la interconversión de serina y glicina.

Genética

El estudio de la influencia de los factores genéticos sobre las necesidades nutricionales es un aspecto muy novedoso, que en el caso del folato adquiere cierta relevancia. De las enzimas que participan en los diferentes aspectos bioquímicos y metabólicos descritos con

anterioridad, la metil-tetrahidrofólico-reductasa (MTHFR) que participa en el ciclo metabólico de la metionina, presenta dos mutaciones que interfieren en el metabolismo, y por tanto en los niveles de folato. Estas mutaciones son las siguientes:

- g) Polimorfismo C677T de la MTHFR. Esta mutación se describió por Kang et al en 1988¹⁰. Los homocigotos para este defecto expresan una variante termolábil de esta enzima. La actividad enzimática está reducida comparada con la normalidad. Los niveles plasmáticos de folato están ligeramente disminuidos y por tanto los de homocisteína elevados (15-20 $\mu\text{mol/l}$). Afecta alrededor de un 10 - 15% de la población, y en la actualidad existen datos insuficientes sobre su relevancia clínica. Los heterocigotos, por el contrario, son más frecuentes, apareciendo en el 40-45% de la población. Según el estado actual del conocimiento, la variante heterocigótica carece de relevancia clínica^{11,12}. Esto es debido a que los defectos enzimáticos de la vía de la remetilación de la homocisteína no provocan incrementos en los niveles de homocisteína en ayunas pero sí tras una sobrecarga importante de la misma. Esto es necesario tenerlo en cuenta a la hora de hacer el test de sobrecarga con metionina, que es el método empleado para identificar el defecto.
- h) Polimorfismo A1298 C de la MTHFR. Esta mutación, menos conocida hasta la fecha, se describió en 1998 por van der Put et al¹³, y da lugar a una menor actividad de la MTHFR. Tanto homocigotos como heterocigotos no presentan mayores niveles de homocisteína, pero parece haber una interacción entre esta mutación y el polimorfismo C677T antes descrito. La heterocigocidad combinada se ha observado en el 20% de la población y sí se asocia a aumento de los niveles de homocisteína¹³.

Consecuencias del déficit clínico

La deficiencia de folato es probablemente el déficit vitamínico más frecuente⁷. Puede deberse a un aporte inadecuado, a trastornos en la absorción, a factores genéticos, a interacciones con medicamentos o a necesidades aumentadas, tal y como se muestra en la tabla 3. A todo ello se unen las limitadas reservas en el organismo. La deficiencia mantenida de folato provoca en último extremo *anemia megaloblástica*,

que se hace manifiesta al cabo de 4 ó 5 meses, debido a una alteración en la maduración de las células de la médula ósea. Esto se traduce en unos cambios morfológicos, llamados megaloblásticos, que afectan a todas las series medulares: granulocíticas, plaquetaria y eritroide. Es en esta última donde los cambios se hacen más evidentes. En la deficiencia de folato, el fallo está en una síntesis inadecuada de ADN, que carece de timidilato, que se forma gracias a la enzima timidilato-sintetasa. Esta requiere de la forma bimetilada del folato, el N-5,10-metilen-THF, encargado de convertir el deoxiuridilato-monofosfato en timidilato. Cuando la forma bimetilada del folato es escasa, el deoxiuridilato-monofosfato y trifosfato se acumulan y se incorporan al ADN por medio de la ADN-polimerasa, que es incapaz de distinguir entre timidilato y deoxiuridilato. El ADN tendrá gran cantidad de deoxiuridilato y esto le impedirá funcionar adecuadamente, mostrando una fase de síntesis mucho más prolongada que en condiciones de suficiencia de folato. Otro mecanismo responsable de la anemia es la hemólisis intramedular, que se produce por la imposibilidad de los macrocitos de abandonar la médula. Estos macrocitos tienen una vida media muy inferior a los hematíes normales. Las alteraciones madurativas se traducen en un asincronismo madurativo núcleo-citoplasma, esto es, una maduración adecuada del citoplasma con suficiente cantidad de hemoglobina y un retraso en la maduración nuclear. Esto se traduce en una división celular lenta, por lo que el tamaño se hace mayor (megaloblástico) ocasionando la salida a sangre periférica de glóbulos rojos inmaduros con un volumen corpuscular medio (VCM) superior a 100 fl.

La serie granulocítica también se afecta, pudiéndose observar en la médula ósea metamielocitos y neutrófilos en banda gigantes y en sangre periférica neutrófilos muy segmentados. Los megacariocitos también se afectan, apareciendo más inmaduros y segmentados, pudiéndose contar 8, 10 o más lóbulos. Por tanto, en la anemia megaloblástica, en sangre periférica observaremos macrocitos con poiquilocitosis, punteado basófilo, anillos de Cabot y disminución del número de reticulocitos. Respecto a la serie granulocítica en sangre periférica observamos leucopenia y polisegmentación neutrófila. Puede existir también trombopenia moderada¹⁴.

Debido a la estrecha interrelación que existe entre el metabolismo del folato y el de la vitamina B₁₂, la anemia megaloblástica aparece cuando existe deficiencia de una o de ambas vitaminas. A veces es

difícil la distinción clínica entre los dos estados carenciales, siendo imprescindible realizar un diagnóstico preciso de la carencia que se padece antes de administrar una u otra vitamina. De hecho, el tratamiento con ácido fólico a pacientes con déficit de cianocobalamina enmascara muchas de las manifestaciones hematológicas de este déficit, manteniéndose así el deterioro del sistema nervioso lo que puede llegar a ser peligroso ¹⁵ por la irreversibilidad de las lesiones.

Consecuencias del déficit subclínico

Alteraciones del sistema nervioso central:

El THF se encuentra también presente en el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo (LCR), donde participa en múltiples reacciones. Los niveles de folato allí se regulan por homeostasis mediante la barrera hemato-encefálica. La concentración de folato en el LCR es de 2 a 3 veces superior a la del plasma. La SAM es el principal dador de grupos de metilo en 35 reacciones de transmetilación, entre ellas, la síntesis de colina y de adrenalina. La colina a su vez participa en la síntesis de acetilcolina, fosfolípidos y esfingomielina. La implicación de las bajas concentraciones de folato en el deterioro cognitivo puede ser debida tanto a un mecanismo vascular como a otros de origen no vascular. En el cerebro, está prácticamente inhibida la transulfuración que es la vía de eliminación de tHcy cuando están aumentados sus niveles. Por tanto, es más fácil la acumulación de tHcy en el cerebro que en otros tejidos. La homocisteína, además de su efecto vascular, compite con los receptores del glutamato, presentando una afinidad mucho mayor. Como es sabido, la sobreexcitación de estos receptores tiene un efecto neurotóxico

Defectos del tubo neural

El déficit de folato en la gestante no produce en ella manifestaciones clínicas, pero puede tener graves consecuencias sobre el feto ocasionándole defectos del cierre del tubo neural. Los defectos del tubo neural (NTD) son las principales malformaciones congénitas del sistema nervioso central. Su incidencia en Europa es de 1,47 por cada 1000 nacimientos¹³. Son debidos a un fallo total o parcial del cierre del tubo neural. Este cierre comienza alrededor del vigésimo día de

gestación en al menos tres localizaciones distintas: cerebro posterior, pros-mesencéfalo y rostral del prosencéfalo, y se va extendiendo hasta completarse. En función de la localización del cierre defectuoso, diferenciamos entre anencefalia, meningomielocelo, meningocele y craneorraquisquisis¹. La deficiencia de folato ocasiona un doble perjuicio sobre este proceso. Por vía directa, al no poder desarrollarse con normalidad la división celular, y por vía indirecta, vía homocisteína (tHcy). Diversos estudios han relacionado niveles bajos, pero no deficitarios, de folato sérico o plasmático con una mayor prevalencia de NTD. El riesgo de NTD disminuye de una forma casi lineal conforme se aumenta la ingesta de folato de la madre durante la fase periconcepcional (de 100 a 400 µg/día)¹⁶, tanto de folatos alimentarios¹⁷ como de suplementos vitamínicos¹⁸. Asimismo, aunque los datos son escasos, hay diversos estudios de casos y controles que han encontrado niveles de tHcy superiores en caso de abortos repetidos¹⁹ y NTD^{20,21} que en controles.

En el estudio de Vollset et al.²² realizado en mujeres noruegas, los niveles elevados de tHcy se relacionaron con complicaciones en el embarazo y parto. Aunque el mecanismo de acción de la tHcy no está del todo esclarecido²³, parece ser que además de citotóxico es neurotóxico. Asimismo, las mutaciones genéticas mencionadas anteriormente parecen constituir un factor de riesgo adicional. La homocigosidad para la mutación 677(C→T) de la MTHFR es un factor de riesgo para los NTD²⁴. Otro estudio realizado en niños con NTD y sus padres demostró que la heterocigosidad combinada para las dos mutaciones de la MTHFR tiene un riesgo similar a la homocigosidad para la mutación 677(C→T) de la MTHFR, y por tanto es un factor de riesgo adicional para NTD; en dicho estudio, el riesgo relativo se duplicaba respecto a los controles¹³.

Depresión

La hipótesis de la relación entre la deficiencia de folato y la depresión tiene sus orígenes en los estudios clásicos de Herbert¹⁴, que experimentó personalmente los efectos de una dieta pobre en folato, apareciendo al cabo de los 4 meses modificaciones en las funciones mentales y en la conducta. Posteriormente, en el estudio realizado por Shorvon et al.²⁵ se observó que el 56% de los pacientes que padecían anemia megaloblástica también presentaba síntomas maniaco-

depresivos. Estos datos han sido confirmados tanto en pacientes psiquiátricos²⁶ como no psiquiátricos²⁷. Además del efecto neurotóxico producido por los niveles elevados de tHcy, la deficiencia de SAM enlentece las reacciones de transmetilación en el SNC, por lo que no se sintetizan los neurotransmisores. En pacientes depresivos se han encontrado niveles reducidos de SAM²⁸, parece ser debido a que existe relación entre el metabolismo del folato y el metabolismo de la serotonina. Una de las hipótesis apunta a la tetrahidrobiopterina como enlace entre los dos metabolismos²⁸.

Demencia senil

La demencia es la principal causa de deterioro cognitivo en el anciano. Diversos estudios han puesto de manifiesto, que tanto pacientes que padecen enfermedad de Alzheimer como los que padecen demencia vascular, presentan niveles plasmáticos bajos de folato y vitamina B₁₂, lo que conduce a niveles elevados de tHcy. Los niveles elevados de tHcy han sido propuestos como un factor de riesgo independiente en la demencia vascular^{29,30}, y también parecen implicados en la fisiopatología de la demencia tipo Alzheimer³¹⁻³³. En el estudio realizado por Snowdon et al³² en monjas norteamericanas, los indicadores neuropatológicos de enfermedad de Alzheimer *post-mortem* fueron correlacionados con los niveles séricos de folato obtenidos en vida antes del diagnóstico de la enfermedad, obteniéndose correlaciones significativas. En su estudio, Clarke et al.³¹ encontraron una fuerte asociación negativa entre los niveles de folato sérico y el riesgo de padecer la demencia tipo Alzheimer. Esto ha sido confirmado recientemente por el estudio de Seshadri et al.³⁴, en el que los niveles elevados de tHcy fueron un factor de riesgo para el desarrollo posterior de la demencia tipo Alzheimer. La relación de homocisteína con folato (también con las vitaminas B₆ y B₁₂) se aproxima al concepto definido por Rosenberg y Miller³⁵ de deficiencia subclínica de vitaminas y función neurocognitiva en el anciano. En la revisión bibliográfica realizada por nosotros³⁶, ya proponemos que los niveles elevados de tHcy pueden ser un marcador temprano y sensible de deterioro cognitivo; resultados preliminares de nuestro grupo así lo sugieren.

Cáncer:

Varias son las hipótesis que relacionan la deficiencia de folato con la carcinogénesis. El folato es esencial para la síntesis, metilación y reparación del ADN, por lo que se ha sugerido que la metilación del ADN es uno de los principales mecanismos que intervienen en la expresión genética, estabilidad del ADN y sensibilidad a las mutaciones^{37,38}. De hecho, se ha observado una modificación en el patrón de metilación del ADN en las células tumorales. La hipometilación, tanto global como localizada, es una de las características observadas en la carcinogénesis en humanos^{39,40}. Se han descrito asociaciones entre el estado global de metilación y las etapas premalignas en algunos tumores, como son de hígado, estomago⁴¹, ovario⁴² y cuello uterino^{43,44}.

La alteración en la expresión genética se ha comprobado por el aumento del ARNm en algunos protooncogenes, c-fos, c-HA-ras, etc. Siendo observado como un efecto concomitante de la hipometilación del ADN⁴⁵. En ratas, se ha observado una hipometilación localizada dentro del gen supresor del p 53, debido a la disminución de los niveles plasmáticos de folato⁴⁶. Otra de las hipótesis, aunque todavía menos estudiada, es que el 5-10 metilen-THF, por metilación de un residuo de uracilo de la desoxiuridina monofosfato (dUMP) da lugar a dTMP (desoxitimidina monofosfato). La deficiencia de folato conduce a una menor síntesis de timidina, aumentando el pool de desoxiuridilato. La disminución de folato da lugar a un aumento del uracilo en las células de la médula ósea y en los leucocitos periféricos³⁸.

El cáncer es una enfermedad multifactorial sobre un sustrato genético. Muchos son los estudios epidemiológicos realizados sobre este tema; en relación con el folato, merecen especial consideración los siguientes:

Cáncer de colon y recto:

La primera vez que se relacionaron los niveles de folato con el cáncer o displasia colorrectal, fue en pacientes con colitis ulcerosa. Varios son los mecanismos que provocan esta mayor incidencia: la disminución de la ingesta, la disminución de la absorción y por el propio tratamiento de la enfermedad con sulfasalazina, inhibidor de la absorción del folato. Algunos autores afirman que la suplementación con folato en enfermos con colitis ulcerosa, reduce el riesgo de displasia

colorrectal⁴⁵. Otros estudios relacionan los niveles de folato con los adenomas colorrectales, señalando una disminución de la concentración del folato intraeritrocitario en pacientes con adenomas rectales⁴⁷. El efecto terapéutico del folato, también ha sido estudiado. En el estudio de Cravo et al⁴⁸, la suplementación con ácido fólico provocó una mejoría en la metilación de las células del epitelio colorrectal en pacientes diagnosticados de cáncer de colon. En cambio, otros autores⁴⁹ desaconsejan la suplementación con ácido fólico por provocar el crecimiento tumoral.

Cáncer de mama:

Las dietas ricas en vegetales y frutas parecen disminuir el riesgo, mientras que la ingesta baja de vegetales y el consumo alto de alcohol aumentan el riesgo de padecer la enfermedad^{50,51}. Sin embargo, otros autores no confirman esta relación^{52,53}.

Displasia y cáncer de útero:

Algunos autores sugieren que la displasia cervical está relacionada con niveles bajos de folato y que esta displasia podría ser reversible, pues responde a dosis altas de folato (10 mg/día)⁵³. Asimismo, varios estudios sugieren que el aumento de la ingesta de folatos, puede disminuir el riesgo de padecer cáncer de útero^{37,54}.

Cáncer de pulmón, cáncer de esófago y estómago:

No parecen existir datos suficientes para relacionar estos tipos de cánceres con los niveles de folatos⁵⁵.

Aterosclerosis

La implicación del folato en la fisiopatología de la aterosclerosis es a través de la tHcy. El mecanismo fisiopatológico por el que la hiperhomocisteinemia condiciona la lesión cardiovascular no está del todo esclarecido. La evidencia indica que interactúa directa y/o indirectamente sobre el proceso aterogénico, contribuyendo por una parte a la disfunción endotelial y por otra facilitando la trombogénesis.

Además del folato, otras 3 vitaminas del grupo B están implicadas en el ciclo metabólico de la metionina (B₂, B₆, B₁₂). La deficiencia de una o varias de estas vitaminas es capaz de inducir a una hiperhomocisteinemia, aunque el folato parece ser el más importante a la hora de determinar los niveles de homocisteína (tHcy)^{56,57}.

La hiperhomocisteinemia está considerada hoy como un factor de riesgo independiente de las enfermedades cardiovasculares, incluyendo las enfermedades coronarias y la patología cerebrovascular²⁹. Aunque en la última década se ha reducido la mortalidad debido a la difusión de medidas de salud pública, las mejoras nutricionales y la promoción de la actividad física, para el año 2020 esta patología seguirá ocupando el primer lugar como causa de muerte en los países occidentales.

Alteraciones en el metabolismo de la homocisteína fueron identificadas por primera vez en 1962⁵⁸ al analizar la orina de niños con retraso mental, surgiendo entonces el concepto homocistinuria. Dos años después se pudo atribuir esta homocistinuria a un defecto congénito en la enzima cistationina–beta-sintetasa, que cursaba además con niveles plasmáticos muy elevados de homocisteína y episodios tromboembólicos. De hecho, el 50% de los niños que presentaban este cuadro clínico fallecían por enfermedad cardiovascular⁵⁹. En 1969 McCully⁶⁰ en un trabajo ya clásico, describió la patología vascular en estos pacientes que incluía, entre otros cambios, proliferación de las células musculares lisas, estenosis arterial y cambios hemostáticos. Desde entonces hasta ahora, pero en especial en la última década, han sido múltiples los esfuerzos realizados para profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo independiente o asociado a la enfermedad cardiovascular.

Son múltiples los estudios epidemiológicos que han puesto de manifiesto la relación entre la hiperhomocisteinemia y la enfermedad cardiovascular. En el metanálisis realizado por Boushey et al²⁹, se analizaban los datos de 27 estudios realizados entre 1988 y 1994. Por cada incremento de 5 $\mu\text{mol/l}$ tHcy, el riesgo relativo (RR) de enfermedad coronaria aumentaba 1,6 (intervalo de confianza 95%: 1.4-1.7), estableciendo los autores que la elevación en los niveles de homocisteína se puede considerar un factor de riesgo independiente.

Estudios más recientes corroboran estos resultados⁶¹⁻⁶³, aunque también hay en la actualidad algunos grupos que cuestionan este aspecto^{64,65}, ya que no ha sido demostrada una relación inequívoca de causalidad (para profundizar en este tema, se puede consultar la revisión reciente realizada por González-Gross et al⁶⁶). En cualquier caso, en pacientes diagnosticados aparecen niveles de tHcy elevados y

bajos los de folato⁵⁷. La importancia del folato en este proceso también se ve confirmada por los datos obtenidos en el *Canadian Nutrition Survey*⁶⁷, donde a medida que aumentan los niveles plasmáticos de folato se produce una disminución del riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria.

Metodología diagnóstica

Tal y como se indica en la tabla 4, el diagnóstico biopatológico de una deficiencia en folato se puede hacer por métodos morfológicos y/o bioquímicos.

Métodos morfológicos:

Tal y como se ha descrito anteriormente, la deficiencia de folato conduce a una hipersegmentación de neutrófilos y finalmente a anemia megaloblástica. En términos prácticos y como regla nemotécnica, se aplica la llamada “regla del 5”: tras contar 100 neutrófilos, la presencia de más de un 5% que contengan 5 o más lóbulos (media de lóbulos superior a 3,6) es indicativa de hipersegmentación¹⁴ (tabla 5). El recuento normal de lóbulos da una media inferior a 3,2.

Métodos bioquímicos:

Radioinmunoanálisis. Es el método de referencia. Se trata de un análisis competitivo entre ligandos, en el cual el folato plasmático del paciente se mezcla con cantidades constantes de I¹²⁵ fólico y ambos compiten por unirse a la proteína fijadora de folato (FBP) que también se encuentra en cantidad constante. Cuanto mayor sea la cantidad de folato en la muestra hemática menor será la unión del fólico marcado a la FBP y viceversa. Previamente, es preciso liberar el folato endógeno de su unión con las distintas proteínas transportadoras presentes en plasma. En este radioinmunoanálisis, la separación de la radioactividad fijada de la no fijada se realiza mediante separación magnética y decantación del sobrenadante.

Análisis mediante captación iónica. En este método, la matriz de fibra de vidrio de la celdilla de reacción se ha recubierto de un compuesto de amonio cuaternario de elevado peso molecular, que le confiere una carga positiva y la capacidad de capturar compuestos de carga negativa. Durante el análisis, se forman complejos cargados

negativamente, utilizando un reactivo de afinidad soluble compuesto de una proteína folato-ligante unida a anticuerpos monoclonales y ligados a su vez a carboxi-metil-celulosa. Existe un método automatizado de inmunoanálisis de fluorescencia polarizada comercializado por IMX Abbott.

Muestras:

Se pueden utilizar muestras de sangre total, suero o plasma, en cualquier caso deben ser obtenidas en ayunas y una vez extraída la sangre, la muestra debe preservarse de la luz.

Folato en suero o plasma:

La técnica del folato sérico se puede hacer con suero o plasma, este último obtenido por sangre anticoagulada con EDTA tripotásico, citrato sódico u oxalato potásico. El suero o plasma debe ser separado de los hematíes lo antes posible, y siempre antes de las 24 horas. El suero se puede almacenar durante una semana entre 2 y 8° C, o congelado a -20 ° C durante un mes. Las muestras de plasma no se deben almacenar más de una semana en ningún caso.

Folato intraeritrocitario:

La muestra de sangre total para esta técnica anticoagulada con los anticoagulantes citados anteriormente, se puede almacenar a temperaturas de entre 2 y 8 ° C pero sólo durante 24 horas.

Niveles circulantes de folato

Los niveles de folato sérico son muy variables y dependen de la ingesta diaria. Personas sin deficiencia pueden presentar niveles plasmáticos bajos y personas con deficiencia los pueden tener normales. No obstante, unos niveles séricos bajos suelen representar la primera etapa del balance negativo en folatos y preceder al déficit tisular. El folato intraeritrocitario es mucho más estable, sólo está disminuido cuando hay una ingesta baja por malabsorción, aumento de necesidades o interacción medicamentosa mantenida durante meses.

Esta determinación representa la segunda etapa en el déficit de folato y en el caso de estar disminuido, guarda una estrecha relación con los niveles tisulares de folato.

Valores de referencia

Los niveles plasmáticos de folato son considerados indicadores de la ingesta reciente de folato. Según diversos autores^{68,69}, se consideran normales valores superiores a 6 ng/ml; un déficit moderado se corresponde con valores entre 3 y 6 ng/ml y un déficit importante con valores inferiores a 3 ng/ml (tabla 5).

Los niveles de folato eritrocitario se consideran indicadores de las reservas de la vitamina en el organismo, ya que el glóbulo rojo capta el folato durante su formación en la médula ósea y mantiene la concentración constante durante los 120 días de vida media del hematíe. La concentración eritrocitaria en folato se correlaciona con los niveles hepáticos de reserva, y disminuye al cabo de unos meses de deficiencia mantenida⁷⁰. Se consideran niveles normales aquellos superiores a 150 ng/ml¹⁵, aunque algunos autores rebajan esta cifra a 125 ng/ml⁷¹.

En relación con la prevención de los defectos del tubo neural, Daly et al.¹⁶ establecen unos valores de referencia en función de la probabilidad de una gestación con algún defecto congénito (tabla 6), considerando estos autores que el menor riesgo va asociado a niveles eritrocitarios de folato superiores a 400 ng/ml.

Tratamiento del déficit clínico

Consiste en la administración por vía oral o parenteral de dosis farmacológicas de la vitamina. La cantidad que se administra habitualmente es de 5 mg/día de ácido fólico. Las consecuencias del déficit clínico han sido expuestas previamente y es, lógicamente, cuando éstas consecuencias se han puesto de manifiesto cuando es ineludible recurrir a este tratamiento. Los procesos y circunstancias que pueden conducir a un déficit de folatos se relacionan en la tabla 3ª, destacar aquí solamente las anemias hemolíticas y las dermatitis exfoliativas, en las que se pierde gran cantidad de folato, debido a la destrucción celular y descamación. La pérdida en folato se ve agravada al asociar como tratamiento el metotrexate, potente inhibidor de la síntesis de esta vitamina.

Tratamiento preventivo del déficit subclínico: suplementación con ácido fólico

En base a los datos obtenidos en diversos estudios recientes⁷²⁻⁷⁵ y las conclusiones de diversas revisiones bibliográficas y metanálisis publicados recientemente^{36,76}, la prevalencia de deficiencia de folato entre la población anciana es frecuente en los países desarrollados. Debido a la implicación de esta vitamina en los múltiples procesos descritos, parece indicada su suplementación. En el reciente estudio de Rydlewicz et al.⁷⁷, en el que suplementaron con distintas dosis de ácido fólico a personas entre 65 y 75 años durante 6 semanas, aquellos que tomaron 400 y 600 µg/día presentaron niveles significativamente menores de tHcy que los controles. Los autores concluyen que sería necesaria una ingesta de 926 µg/día para garantizar que el 95% de la población anciana no tuviera riesgo cardiovascular debido a deficiencia de folato, algo sólo alcanzable mediante la suplementación. Debido al estado de malnutrición que puede presentar este colectivo, algunos autores indican que puede estar más indicada la administración de un suplemento polivitamínico⁷⁸.

El tratamiento preventivo más conocido es el que se administra durante el embarazo, en el cual las recomendaciones de folato aumentan hasta 5 – 10 veces respecto a las condiciones normales (tabla 1). No se debe olvidar que están relacionados con la deficiencia en folato, además de los defectos en el cierre del tubo neural, el parto prematuro, la toxemia del embarazo y el desprendimiento prematuro de la placenta. Por tanto, para todas las mujeres que estén planeando un embarazo, diversos organismos recomiendan un suplemento de 400 µg/día de ácido fólico al menos desde 4 semanas antes de la fecundación^{1,5}. Esto es debido, a que el cierre del tubo neural se produce alrededor del día 28 de gestación, cuando todavía se desconoce el embarazo. Esta suplementación debe mantenerse a lo largo de todo el embarazo por los efectos adversos citados anteriormente.

El alcohol, el tabaco y el café^{73,79,80} son determinantes de los niveles de folato sérico, por lo que puede estar indicada una suplementación en aquellas personas que presentan un consumo elevado de los mismos.

Prevención del déficit subclínico

Nuevas ingestas recomendadas

Las nuevas ingestas recomendadas o ingestas de referencia (DRI)¹ promulgadas por algunos organismos internacionales representan una nueva aproximación para aportar estimaciones cuantitativas de la ingesta óptima de nutrientes. Estas nuevas recomendaciones incluyen criterios novedosos. Para su formulación, además de los factores clásicos, como son los fisiológicos (edad, sexo, gestación o lactancia, etc), se tienen en cuenta otros, como son factores medioambientales y de estilo de vida, así como la descripción de nuevas funciones de ciertos componentes alimenticios tal y como ha sido revisado recientemente por Joyanes et al.². Entre estas nuevas funciones cabe destacar el potencial preventivo que conlleva cada nutriente. En el caso del folato, varios estudios sugieren que el aumento en la ingesta de folatos puede disminuir el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer, como la neoplasia cervical⁵⁵ y los defectos del tubo neural. Otros aspectos, como la relación con enfermedades cardiovasculares, depresión y demencia, aunque se mencionan no han sido objeto de consideración específica dado que se necesita disponer de mayor evidencia científica¹.

Específicamente para el folato, las ingestas recomendadas se han duplicado con respecto a las anteriores pasando de 200 a 400 µg/día. La ingesta clásicamente recomendada para adultos (200 µg/día⁸¹) se considera que sólo conseguía evitar la deficiencia clínica pero no la deficiencia subclínica, con el consiguiente riesgo para la población que esto podía tener. Una ingesta óptima de folato se incluye en los objetivos nutricionales para la población española propuestos recientemente³. Hay que instar, pues, a la población a cubrir sus ingestas de folato (tabla 1) mediante una selección y manipulación adecuada de alimentos (tabla 2). En caso de no ser esto factible, se deben tomar en consideración otras medidas, como la recomendación del enriquecimiento de alimentos por parte de las autoridades sanitarias.

Enriquecimiento de alimentos

Desde el 1 de enero de 1998, en EE.UU. es obligatorio enriquecer los cereales y derivados con 140 µg de ácido fólico/100 g⁸². En Chile se ha iniciado esta medida el 1 de enero de 2.000⁸³. Otros países, como

Hungría, añaden además de 160 µg de ácido fólico, 0,8 µg de vitamina B₁₂ y 880 µg vitamina B₆ / 100 g de harina desde agosto de 1998⁸⁴ y otros, como Suiza, Sudáfrica o Australia, están evaluando tomar esta medida. Los datos publicados en este contexto⁸⁵⁻⁸⁷ parecen indicar que la medida tomada en EE.UU. está resultando beneficiosa, sobre todo en relación con los NTD, aunque son necesarios mayor número de estudios.

Algunos de ellos están actualmente en curso y habrá que estar atentos a sus resultados para valorar la implementación de estas medidas en los países que todavía no lo han hecho. Cabe cuestionarse la oportunidad de añadir B₁₂ debido a la problemática referida anteriormente del enmascaramiento en la anemia megaloblástica, y a la elevada prevalencia de la deficiencia de B₁₂ entre la población anciana, tal y como han indicado algunos autores⁸³. En la lactancia, la leche materna contiene de 50 a 100 µg de folato por 100 ml, lo que corresponde al requerimiento diario del recién nacido. Durante el crecimiento aumenta la síntesis de DNA, lo que requiere mayor aporte de folato. Estas cantidades deben tenerse en cuenta en las leches de fórmula y alimentos infantiles.

Toxicidad - Niveles máximos tolerables

Los niveles de ingesta máxima tolerables establecidos por el NIH americano¹ se resumen en la tabla 7. Los niveles máximos tolerables se refieren únicamente a la ingesta de ácido fólico de alimentos enriquecidos o de suplementos, siendo para los adultos de 1000 µg/día, no estableciéndose ingestas máximas para los folatos naturales de los alimentos. Este valor ha sido establecido como norma de seguridad dado que se han encontrado niveles de toxicidad para la ingesta de 5 mg al día de ácido fólico.

Conclusión

El folato es una vitamina implicada en importantes reacciones metabólicas. La carencia de folato se manifiesta clínicamente por la aparición de anemia megalobástica y en el caso de la mujer embarazada por la aparición de defectos del tubo neural en el feto. Investigaciones recientes han puesto de manifiesto que un déficit subclínico de folato puede estar implicado en diversos procesos de gran incidencia y gravedad como son depresión, demencia senil (vascular y Alzheimer),

aterosclerosis y ciertos tipos de cáncer. Estos hallazgos han llevado a diversos organismos de salud internacionales a incrementar las ingestas recomendadas de folato, pasando de los 200 $\mu\text{g}/\text{día}$ que se recomendaban para prevenir un estado carencial a los 400 $\mu\text{g}/\text{día}$ que actualmente se recomiendan como ingesta de referencia. Para garantizar este aporte puede ser necesario recurrir a la suplementación vitamínica especialmente en personas ancianas donde el estado carencial subclínico tiene mayor incidencia. En algunos países se recomienda incluso el enriquecimiento con folato de ciertos alimentos.

Bibliografía

1. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B₆, folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline/ a report of the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline and Subcommittee on Upper Levels on Nutrients, Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. Washington, DC: National Academy Press. 1998.
2. Joyanes M, González-Gross M, Marcos A. The need to review the Spanish recommended dietary energy and nutrient intakes [en prensa]. *Eur J Clin Nutr*.
3. Serra-Majem L, Aranceta J; SENC Working Group on Nutritional Objectives for the Spanish Population. Spanish Society of Community Nutrition. Nutritional objectives for the Spanish population. Consensus from the Spanish Society of Community Nutrition. *Public Health Nutr* 2001;4:1409-13.
4. Wagner C. Symposium on the subcelular compartmentation of folate metabolism. *J Nutr* 1996;126:1228S-1234S.
5. DACH. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 1. Auflage. Frankfurt am Main: Umschau/Braus GmbH, Verlagsgesellschaft. 2000.
6. Crawley HF. The role of breakfast cereals in the diets of 16-17-year old teenagers in Britain. *J Hum Nutr Diet* 1993;6:295-216.
7. Bässler KH, Golly I, Loew K, Pietrzik K. *Vitamin-Lexikon*. Govi Verlag, Frankfurt-Main. 2002.
8. Whitehead VM. Polygamaglutamyl metabolites of folic acid in human liver. *Lancet* 1973;1:743-745.
9. Hoppner K, Lampi B. Folate levels en human liver frem autopsies in Canada. *Am J Clin Nutr* 1989;33:862-864.
10. Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988;43:414-421.
11. Blom HJ, Kleinvelde HA, Boers GH, et al. Lipid peroxidation and susceptibility of low density lipoprotein to in vitro oxidation in hiperhomocysteinaemia.. *Eur J Clin Invest* 1995;25:149-54.

12. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *New Engl J Med* 1998;338:1042-1050.
13. Van der Put NMJ, Gabreëls F, Stevens EMB, Smeitink JAM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylentetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects?. *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-1051.
14. Herbert V, Das KC. Folic acid and vitamin B12. En: ME Shils, JA Olson, M Shike, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 8th edition. Malvern, PA: Lea & Febiger, 1994, pp 402-425.
15. Zittoun J. Acide folique: une carence sans consequences? En: *L'alimentation des personnes agees*. Paris: Cidil eds. 1985.
16. Daly LE, Kirke PN, Molloy A, Weir DG, Scott JM. Folate levels and neural tube defects. Implications for prevention. *J Am Med Assoc* 1995;274:1698-1702.
17. Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *J Am Med Assoc* 1993;269:1257-1261.
18. Shaw GM, Schaffer D, Velie EM, Morland K, Harris JA. Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology* 1995;6:219-226.
19. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia and recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae. *Lancet* 1992;339:1122-1123.
20. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM, et al. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural tube defects? *Metabolism* 1994;43:1475-1480.
21. Mills JL, McPartliin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects. *Lancet* 1995;345:149-151.
22. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 2000;71:962-8.

23. Pietrzik K, Brönstrup A. Folate in preventive medicine: a new role in cardiovascular disease, neural tube defects, and cancer. *Ann Nutr Metab* 1997;41:331-343.
24. van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346:1070-1.
25. Shorvon SD, Carney MW, Chanarin I, Reynolds EH. The neuropsychiatry of megaloblastic anaemia. *Br Med J* 1980;281:1036-8.
26. Bottiglieri T, Laundry M, Crellin R, Toone BK, Carney MW, Reynolds EH Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. : *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;69:228-32.
27. Lindeman RD, Romero LJ, Koehler KM, Liang HC, LaRue A, Baumgartner RN, et al. Serum vitamin B12, C and folate concentrations in the New Mexico elder health survey: correlations with cognitive and affective functions. *J Am Coll Nutr* 2000;19:68-76.
28. Bottiglieri T, Hyland K, Laundry M, Godfrey P, Carney MW, Toone BK, et al. Folate deficiency, bipterin and monoamine metabolism in depression. *Psychol Med* 1992;22:871-6.
29. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease. *JAMA* 1995;274:1049-1057.
30. Fassbender K, Mielke O, Bertsch T, Nafe B, Fröschen S, Hennerici M. Homocysteine in cerebral macroangiography and microangiopathy. *Lancet* 1999;353:1586-1587.
31. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folic acid, vitamin B₁₂, and serum homocysteine levels in confirmed Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1998;55:1449-1455.
32. Snowdon DA, Tully CL, Smith CD, Perez Riley K, Markesberry WR. Serum folate and the severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun Study. *Am J Clin Nutr* 2000;71,993-998.
33. Nilsson K, Gustafson L, Faldt R, Andersson A, Brattstrom L, Lindgren A, et al. Hyperhomocysteinaemia - a common finding in a psychogeriatric population. *Eur J Clin Invest* 1996;26,853-859.

34. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 2002;346:476-483.
35. Rosenberg IH, Miller JW. Nutritional factors in physical and cognitive functions of elderly people. *Am J Clin Nutr* 1992;55(6 Suppl):1237S-1243S.
36. Gonzalez-Gross M, Marcos A, Pietrzik K. Nutrition and cognitive impairment in the elderly. *Br J Nutr* 2001;86:313-321.
37. Ziegler RG, Brinton LA, Hamman RF, Lehman HF, Levine RS, Mallin K, et al. Diet and risk of in situ cervical cancer among white women in the United States. *Cancer Causes Control* 1990;2:17-29.
38. Blount BC, Mack MM, Werh GM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:3290-3295.
39. Halsted CH, Gandhi G, Tamura T. Sulfalazine inhibits the absorption of folates in ulcerative colitis. *N Engl J Med* 1981;305:1513-1517.
40. Jones PA(1996) DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res* 56:2463-2467.
41. Cravo M, Pinto R, Fidalgo P, Chaves P, Gloria L, Nobre-leitao C, et al. Global DNA hypomethylation occurs in the early stages of intestinal type gastric carcinoma. *Gut* 1996;39:434-438.
42. Cheng P, Schumutte C, Cofer KF, Felix JC, Yu MC, Dubeau L. Alterations in DNA Methylation are early, but not initial, events in ovarian tumorigenesis. *Br J Cancer* 1997;75:396-402.
43. Kin YI, Giuliano A, Hatch KD, Scheneider A, Nour MA, Dallal GE, et al. Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 1994;74:893-899.
44. Fowler BM, Giuliano A, Plyathilake C, Nour M, Hatch K. Hypomethylation in cervical tissue: is there a correlation with folate status? *Cancer Epidemiol* 1998;7:901-906.
45. Fang JY, Xiao SD. Alteration of DNA methylation in gastrointestinal carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:960-8.

46. Kim YI, Pogrbny IP, Basnakian AG, Miller JW, Selhub J, James SJ, et al. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. *Am J Clin Nutr* 1995;65:46-52.
47. Paspatis GA, Kalafatis E, Oros L, Xourgias V, Koutsoumpa P, Karamanolis DG. Folate status and adenomatous colonic polyps. A colonoscopically controlled study. *Dis Colon Rectum* 1995;38:64-67.
48. Cravo M, Fidalgo P, Pereira AD, Gouveira-Oliveira A, Chaves P, Selhub J, et al. DNA methylation as an intermediate biomarker in colorectal cancer: modulation by folic acid supplementation. *Eur J Cancer Prev* 1994;3:473-479.
49. Ryan BM, Weir DG. Relevance of folate metabolism in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Lab Clin Med* 2001;138:164-76.
50. Graham S, Hellmann R, Marshall J, Freudenheim J, Vena J, Swanson M, et al. Nutritional epidemiology of postmenopausal breast cancer in western New York. *Am J Epidemiol* 1991;134:552-566.
51. Freudenheim JL, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Brasure JR, Swanson MK, et al. Premenopausal breast cancer risk and intake of vegetables, fruits, and related nutrients. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:340-348.
52. Zhang S, Hunter DJ, Hankinson SE, Giovannucci EL, Rosner BA, Colditz GA, et al. A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. *JAMA* 1999;281:1632-1637.
53. Terry P, Suzuki R, Hu FB, Wolk A. A prospective study of major dietary patterns and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1281-5.
54. Potischman N, Brinton LA, Laiming VA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, et al. A case-control study of serum folate levels and invasive cervical cancer. *Cancer Res* 1991;51:4785-4789.
55. Prinz-Langenohl R, Fohr I, Pietrzik K. Beneficial role for folate in the prevention of colorectal and breast cancer. *Eur J Nutr* 2001;40:98-105.
56. Pietrzik K, Bronstrup A. Vitamins B12, B6 and folate as determinants of homocysteine concentration in the healthy population. *Eur J Pediatr* 1998;157 Suppl 2:S135-8.

57. Fernández-Miranda C, Aranda JL, Gómez González P, Díaz-Rubio P, Estenoz J, Gómez de la Cámara A. La hiperhomocisteinemia es frecuente en pacientes con enfermedad coronaria. Estudio de 202 enfermos. *Med Clin (Barc)* 1999; 113:407-410.
58. Gerritsenn T, Vaughan JG, Waisman HA. The identification of homocysteine in the urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1962;9:493-496.
59. Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L. Homocystinuria: an enzymatic defect. *Science* 1964;143:1443-1445.
60. Mc Cully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56:111-28.
61. Aronow WS, Ahn C. Increased plasma homocysteine is an independent predictor of new coronary events in older persons. *Am J Cardiol* 2000;86:346-347.
62. Vollset SE, Refsum H, Tverdal A, Nygard O, Nordrehaug JE, Tell GS, et al. Plasma total homocysteine and cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Hordaland Study. *Am J Clin Nutr* 2001;74:130-136.
63. Álvarez Sabín J, Turón J, Montaner J, Malinow R, Codina A. Homocisteína plasmática en pacientes con ataques isquémicos transitorios. *Med Clin (Barc)* 1999;113:531-532.
64. Brattstrom L, Wilcken DE. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am J Clin Nutr* 2000;72:315-23.
65. Knet P, Reunanen A, Alfthan G, Heliovaara M, Rissanen H, Marniemi J, et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor or a consequence of coronary heart disease? *Arch Intern Med* 2001;161:1589-94.
66. Gonzalez-Gross M, Sola R, Castillo MJ, Pietrzik K. Homocisteína y riesgo cardiovascular [en prensa]. *Investigación Clínica*.
67. Morrison HI, Schaubel D, Desmeules M, Wigle DT. Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. *JAMA*. 1996;275:1893-1896.
68. Roe DA. Nutritional assessment of the elderly. *World Rev Nutr Diet* 1986;48:85-113.
69. Keller HE, Salkeld RM. Bereichswerte von Analysenparametern fuer den Vitaminstatus. *GCR* 1988; 106:334.

70. Pietrzik K. Concept of borderline vitamin deficiencies. *Int J Vitam Nutr Res Suppl* 1985;27:61-73.
71. Kuebler W. Vitaminmangel und seine Folgen. *Bibl Nutr Dieta* 1988;42:2-6.
72. Serra Majem L, Ribas Barba L, Armas Navarro A, Alvarez Leon E, Sierra A; Equipo de investigacion de ENCA. Ingesta de energía y nutrientes y riesgo de ingesta inadecuada en las Islas Canarias (1997-98). *Arch Latinoam Nutr* 2000;50(1 Suppl 1):7-22.
73. Christodoulakos G, Panoulis C, Rizos D, Moustakarias T, Phocas I, Creatsas G. Homocysteine and folate levels in postmenopausal women. *Maturitas* 2001;39:161-7.
74. Marshall TA, Stumbo PJ, Warren JJ, Xie XJ. Inadequate nutrient intakes are common and are associated with low diet variety in rural, community-dwelling elderly. *J Nutr* 2001;131:2192-6.
75. Ventura P, Panini R, Verlatto C, Scarpetta G, Salvioli G. Hyperhomocysteinemia and related factors in 600 hospitalized elderly subjects. *Metabolism* 2001;50:1466-71.
76. Aranceta J, Serra Majem L, Ortega RM, Entrala A, Gil A. Las vitaminas en la alimentación de los españoles. Estudio EVE Libro Blanco. Laboratorios Roche. 2000.
77. Rydlewicz A, Simpson JA, Taylor RJ, Bond CM, Golden MH. The effect of folic acid supplementation on plasma homocysteine in an elderly population. *QJM* 2002;95:27-35.
78. Chandra RK. Effect of vitamin and trace-element supplementation on cognitive function in elderly subjects. *Nutrition* 2001;17:709-12.
79. Ortega RM, Lopez-Sobaler AM, Gonzalez-Gross MM, Redondo RM, Marzana I, Zamora MJ, et al. Influence of smoking on folate intake and blood folate concentrations in a group of elderly Spanish men. *J Am Coll Nutr* 1994;13:68-72.
80. Brussaard JH, Lowik MR, van den Berg H, Brants HA, Goldbohm RA. Folate intake and status among adults in the Netherlands. *Eur J Clin Nutr* 1997;51 Suppl 3:S46-50.

81. NRC (National Research Council). Recommended Dietary Allowances. 10th edition. Report of the Subcommittee on the tenth edition of the RDAs, Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences. Washington, DC: National Academy Press. 1989.
82. FDA (Food and Drug administration). Folic acid to fortify food products to prevent birth defects.
www.cfsan.fda.gov/~lrd/hhsfolic.html. 1996.
83. Hirsch S, de la Maza P, Barrera G, Gattas V, Petermann M, Bunout D. The Chilean flour folic acid fortification program reduces serum homocysteine levels and masks vitamin B-12 deficiency in elderly people. *J Nutr* 2002;132:289-91.
84. Czeisel AE, Merhala Z. Bread fortification with folic acid, vitamin B12, and vitamin B6 in Hungary. *Lancet* 1998;352:1225.
85. Boushey CJ, Edmonds JW, Welshimer KJ. Estimates of the effects of folic-acid fortification and folic-acid bioavailability for women. *Nutrition* 2001;17:873-9.
86. Choumenkovitch SF, Jacques PF, Nadeau MR, Wilson PW, Rosenberg IH, Selhub J. Folic Acid Fortification Increases Red Blood Cell Folate Concentrations in the Framingham Study. *J Nutr* 2001;131:3277-3280.
87. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LY. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA* 2001;285:2981-6.
88. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. Tablas de composición de alimentos. Madrid: Editorial Pirámide. 1995.

TABLAS:

Tabla 1. Ingestas recomendadas de folato¹

Edad	Folato* ($\mu\text{g}/\text{día}$)	
	Varones	Mujeres
0 – 6 meses	65	65
7 – 12 meses	80	80
1 – 3 años	150	150
4 – 8 años	200	200
9 – 13 años	300	300
14 – 18 años	400	400 ^a
19 – 30 años	400	400 ^a
31 – 50 años	400	400 ^a
51 – 70 años	400	400
> 70 años	400	400
Embarazo		600 ^b
Lactancia		500

a = en mujeres que estén planificando un embarazo, se recomienda una ingesta adicional diaria de 400 μg en forma de suplementos o alimentos enriquecidos

b = se asume que las mujeres seguirán tomando la ingesta adicional diaria de 400 μg en forma de suplementos o alimentos enriquecidos al menos durante las primeras 8 semanas de gestación

* 1 μg FE = 1 μg folatos alimentarios = 0.5 μg ácido pteroilmonoglutámico (ácido fólico)

Tabla 2. Alimentos ricos en folato

Alimento	µg/100 g alimento (porción comestible)
Verduras y hortalizas	
- grelos	110
- coles	79
- judías verdes	60
- espinacas, acelgas	140
- tomate,	28
- remolacha	90
Fruta	
- plátano	22
- naranja	37
- melón	30
- fresa, frambuesa y fresón	20
Frutos secos	
- pistachos	58
- cacahuetes	110
- almendras	96
Legumbres	
- garbanzos	180
- lentejas	35
Leche y productos lácteos	
- queso brie, camembert, roquefort, cabrales	50
Carnes y vísceras	
- Hígado	192
- Riñones	77
- Carne vacuno y pollo	10
Pescado	
- Salmón	26
- pez espada, bonito y atún	15

* Fuente: 88

Tabla 3. Causas de deficiencia de folato

<p>Aporte deficitario: Elección incorrecta de alimentos Pérdidas debidas a almacenamiento y cocinado incorrectos Restricciones dietéticas frecuentes y mal planteadas Consumo elevado de alcohol</p>	
<p>Trastornos en la absorción: Enfermedad celiaca Esprue tropical Enfermedad de Wipple Esclerodermia Amiloidosis Diverticulosis intestinal Consumo crónico de alcohol</p>	
<p>Necesidades aumentadas: Embarazo Lactancia Prematuridad Crecimiento Hemólisis crónica Dermatitis exfoliativa crónica Situaciones hiper-catabólicas (postoperatorio, quemaduras) Hemodiálisis</p>	
<p>Trastornos congénitos del metabolismo: Homocistinuria</p>	
<p>Interacciones con fármacos: Metrotrexate Pirimetamina Trimetropin Procuanil Sulfasalazina Triamterene</p>	<p>Mecanismos de la interacción: Impiden la reducción del dihidrofolato a tetrahidrofolato, esta acción se puede evitar si junto a estos medicamentos se asocia ácido fólico.</p> <p>Inhibidores de la síntesis</p> <p>Inhiben la reducción de los ribonucleótidos</p> <p>Destruye la metil-cobalamina, la cual impide la acción de la metil-transferasa y se produce un atrapamiento de la forma metilada del folato, provocando una anemia megaloblástica aguda.</p>
5-Fluoracilo 6-Azauridina Zidovudina	
Arabinoso de citosina Hidroxiurea	
Fenobarbital Difenil hidantoina Primidona Fenitoina	
Anticonceptivos orales Cicloserina Glutetimida	
Oxido nitroso	

Tabla 4. Modificaciones bioquímicas y morfológicas características de la deficiencia de folato¹⁴

<ul style="list-style-type: none"> - Disminución de la concentración de folato en plasma - Elevación de los niveles de homocisteína en plasma - Aumento de la tasa de segmentación de los neutrófilos - Aumento en la excreción urinaria de ácido forminoglutámico - Disminución de la concentración de fólico eritrocitario - Macroovalocitosis en sangre periférica y megaloblastia en la médula espinal - Anemia megaloblástica

Tabla 5. Valores de referencia para el diagnóstico de deficiencia en folato ^{68,69}

Variable	Valor
- Concentración de folato plasmático	< 3 ng/ml (< 6.8 nmol/l)
- Niveles plasmáticos de homocisteína	> 8 ng/ml (18.1 nmol/l)
- Concentración de folato eritrocitario	< 140 ng/ml (317 nmol/l)
- Tasa de segmentación de neutrófilos	≥ 3.5

Tabla 6. Intervalos de niveles de folato eritrocitario y riesgo de defectos del tubo neural (NTD)*

Folato eritrocitario (µg/L)	Riesgo de NTD
0 – 149	8,25
150 – 199	4,00
200 – 299	2,88
300 – 399	2,00
≥ 400	1,00

* modificado de Daly et al. ¹⁶

Tabla 7. Niveles máximos tolerables de ingesta de ácido fólico ¹

Edad	Ácido fólico (µg/día)	
	Varones	Mujeres
0 – 6 meses	*	*
7 – 12 meses	*	*
1 – 3 años	300	300
4 – 8 años	400	400
9 – 13 años	600	600
14 – 18 años	800	800
19 – 30 años	1000	1000
31 – 50 años	1000	1000
51 – 70 años	1000	1000
> 70 años	1000	1000
Embarazo		
14 – 18 años		800
> 19 años		1000
Lactancia		
14 – 18 años		800
> 19 años		1000

* No se han establecido los niveles máximos tolerables.

FIGURAS:

Figura 1. Estructura del ácido fólico

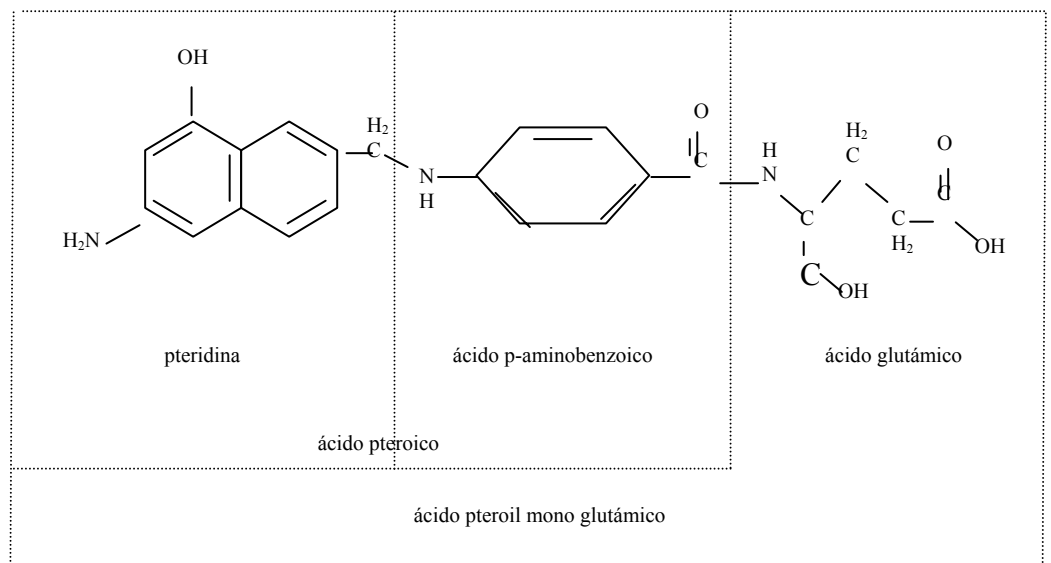
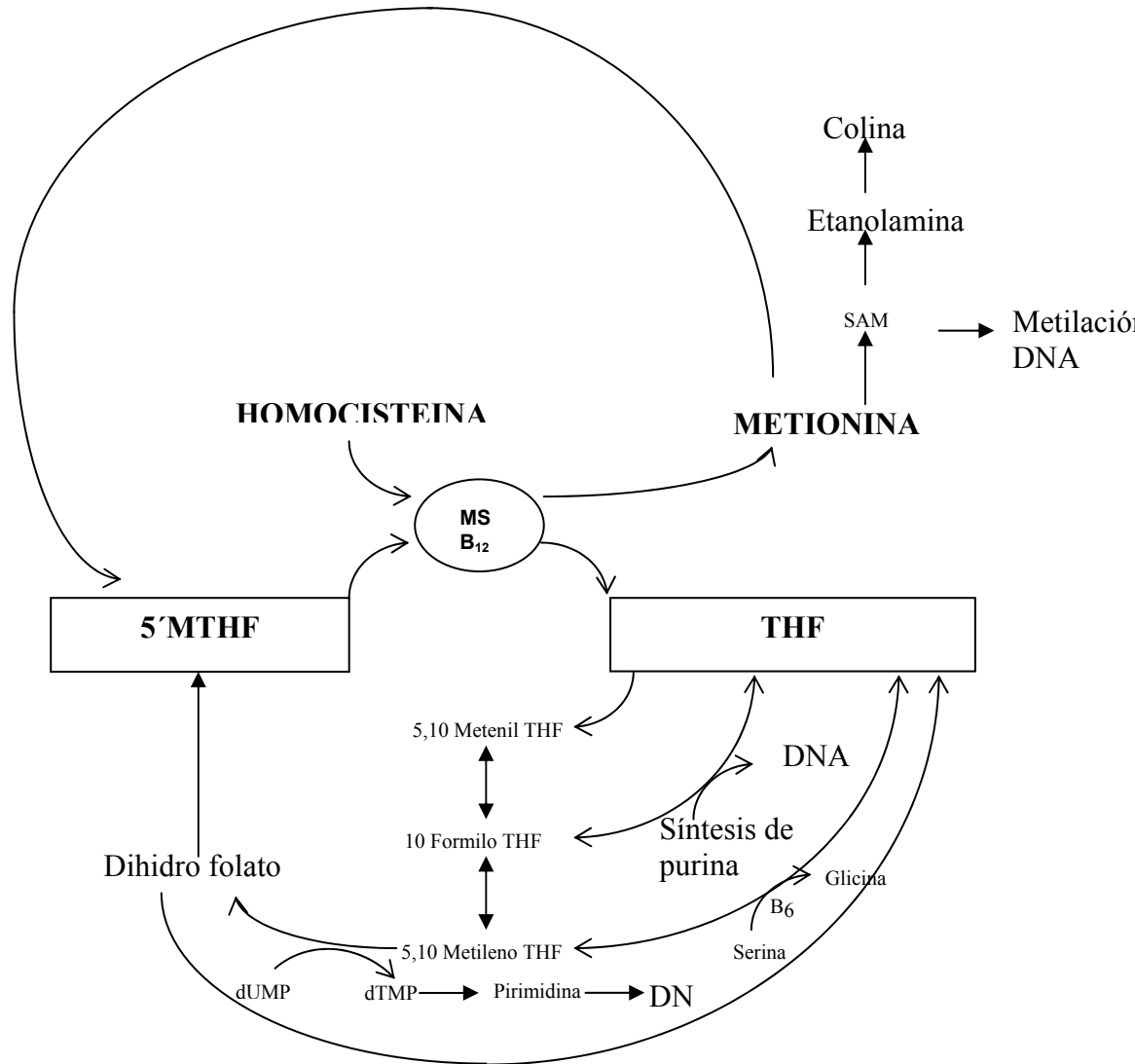


Figura 2. Relaciones metabólicas del folato.



MS: Metionina-sintetasa
 5-MTHF: 5-metil-tetrahidrofólico
 THF: tetrahidrofólico
 SAM: S-adenosil-metionina

VITAMINA B₁₂

¿EXISTE LA NECESIDAD DE UNA DETECCIÓN PRECOZ DEL DÉFICIT DE VITAMINA B₁₂?

Ricardo Sola^{1,2}.Marcela González-Gross^{2,3}. Klaus Pietrzik⁴. Manuel J Castillo²

¹Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada. España.

²Grupo EFFECTS-262, Departamento de Fisiología Médica, Facultad de Medicina de Granada. España.

³Facultad de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte. Universidad Politécnica de Madrid. España.

⁽⁴⁾ Institut für Ernährungs-und Lebensmittelwissenschaften. Pathophysiologie. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität. Bonn. Germany.

Resumen

El ser humano es incapaz de sintetizar vitamina B₁₂ por sí mismo, toda la que necesita debe ser aportada casi exclusivamente por los alimentos de origen animal. La vitamina B₁₂ es imprescindible para la correcta función neurológica y la formación de elemento formes de la sangre. Su déficit, de gran prevalencia, sobre todo en la población anciana¹ y en vegetarianos, provoca a largo plazo anemia megaloblástica y todo su cortejo de alteraciones neurológicas. Especial importancia se atribuye al déficit subclínico que implica alteraciones inespecíficas del sistema nervioso central y periférico, sin que existan todavía alteraciones hematológicas que permitan sospechar la deficiencia, por esto es muy importante el diagnóstico precoz y el tratamiento adecuado antes de que estas alteraciones neurológicas se hagan irreversibles. En este artículo se revisan las técnicas analíticas disponibles en la actualidad que permiten el diagnóstico precoz de la deficiencia de B₁₂ y donde el coste-beneficio debe ser valorado.

Introducción

En la literatura médica y en este artículo, los términos cianocobalamina, cobalamina (Cbl) y vitamina B₁₂ se utilizan indistintamente². Aunque, en sentido estricto, la vitamina B₁₂ es la cianocobalamina, otras cobalaminas también han demostrado similares propiedades nutricionales.

La cobalamina metabólicamente activa se encuentra bajo dos formas, la 5´deoxiadenosilcobalamina y la metilcobalamina. Bajo el punto de vista farmacológico, se emplea la hidroxicobalamina y la cianocobalamina aunque esta tiene menor capacidad de unión a las proteínas séricas y se excreta más rápidamente³.

La vitamina B₁₂ pertenece a la familia de las corrinas y está formada por un nucleótido, el 5,6-dimetil-benziminazol y por un anillo corrínico (fig 1). El 40-50% de las corrinas séricas están en forma de análogos de la vitamina B₁₂, fisiológicamente inactivos, pero compiten con la vitamina B₁₂ para ocupar su transportador sérico.

La vitamina B₁₂ actúa como cofactor para convertir el Metilmalonil CoA en Succinil CoA, además es necesaria para la síntesis de Metionina a partir de la Homocisteína, participa en la síntesis de mielina y junto con el folato en la síntesis de DNA, lo que explica las consecuencias comunes de ambas deficiencias.

Absorción, transporte, depósitos y excreción

Toda la vitamina B₁₂ que necesita el organismo es de origen externo, solo se encuentra en los alimentos de origen animal. Recientemente se ha publicado la biodisponibilidad en vitamina B₁₂ que posee un tipo de alga⁴ y un Té negro japonés⁵.

La absorción se produce en el ileon terminal, pero para que esta sea posible, se necesita: un estomago intacto que segregue una glicoproteína específica, el factor intrínseco de Castle (FI) y el ácido clorhídrico, a propósito se ha demostrado una disminución en los niveles plasmáticos de vitamina B₁₂, durante el tratamiento con omeprazol⁶. El medio ácido del estómago y la pepsina, facilitan la separación de la B₁₂ de las proteínas de los alimentos a los que se encuentra unida. También pacientes con insuficiencia pancreática,

pueden tener disminuida la absorción de Cbl, aunque rara vez llegan a tener deficiencia⁷.

En la luz gastro-intestinal, la B₁₂, ya disociada de las proteínas, se une a las haptocorrinas, proteínas segregadas por las glándulas salivares y la mucosa gástrica. En el intestino delgado, las proteasas pancreáticas, degradan las haptocorrinas, liberándose la B₁₂ que se une al FI, el complejo resultante, B₁₂-FI, se une a los receptores de la mucosa ileal. Aproximadamente 3-4 horas después de la ingesta, la B₁₂ es absorbida ingresando en circulación. La falta de FI da lugar a la anemia perniciosa.

En plasma, la vitamina B₁₂ se une para su transporte a unas proteínas plasmáticas específicas, la transcobalamina I, II y III. Solo la B₁₂ unida a la Transcobalamina II puede ser internalizada por las células mediante un receptor específico que permite dicha internalización^{8,9}. Solo el 6-20% de la cobalamina circulante, se encuentra unida a la transcobalamina II. La unión B₁₂-transcobalamina II constituye la llamada Holotranscobalamina II, la determinación de este complejo parece ser importante en el diagnóstico precoz del déficit vitamínico que nos ocupa, aunque se necesitan más estudios para determinar el valor de esta prueba en el diagnóstico precoz de dicho déficit⁸. La deficiencia de transcobalamina II da lugar a una anemia megaloblástica muy severa en la infancia¹⁰, la deficiencia de transcobalamina I y III parece ser benigna¹¹.

La cianocobalamina se acumula en ciertos tejidos que hacen la función de depósitos de reserva, entre ellos destaca el hígado. El contenido de B₁₂ almacenada en el hígado de adultos es aproximadamente de 1 µg/g de tejido^{12,13}.

La cantidad de B₁₂ total almacenada en el organismo va desde los 0.6 mg¹⁴ a los 3.9 mg¹⁵, otros autores estiman esta cantidad entre los 2 y 3mg¹⁶⁻¹⁹. La excreción de B₁₂, es proporcional a los depósitos y ocurre principalmente a través de las heces²⁰, también en menor cantidad por la orina^{17,18,21}. Se pierde vitamina B₁₂, de forma diaria, en una cantidad que oscila entre el 0.1-0.2 %^{22,23}.

DÉFICIT CLÍNICO DE VITAMINA B₁₂:

Ya sea por déficit nutricional, disminución de la absorción por causa gástrica o intestinal, alteraciones en el transporte sérico de la

vitamina B₁₂, o alteraciones metabólicas congénitas, el estadio final del déficit, es la anemia megaloblástica.

De comienzo insidioso, suele pasar inadvertido, el enfermo acude al médico por cansancio, disnea de esfuerzo, palpitaciones, dolores angoroides, síntomas estos comunes a cualquier anemia establecida.

Se afectan las tres series medulares, dando lugar a leucopenia, anemia y trombopenia, en ocasiones de origen autoinmune²⁴. La anemia, es macrocítica, con un volumen corpuscular medio (VCM) superior a 100 fl, debiéndose hacer el diagnóstico diferencial con otras causas de macrocitosis, que cursan con niveles de vitaminas normales².

La serie mielopoyética también se afecta, apareciendo leucopenia, gigantismo y el signo más patognomónico la polisegmentación neutrófila²⁵, hallazgo típico de la anemia megaloblástica establecida. También puede haber trombopenia.

Mención especial por su incidencia merece la anemia perniciosa de Addison-Biermer. Propia de la presenilidad y vejez fué descrita por Addison en 1855 y completada clínicamente por Biermer en 1872. Esta enfermedad se produce por una disminución de la absorción intestinal de vitamina B₁₂.

Etiopatológicamente el estómago de estos enfermos deja de segregar FI. Hoy en día, se conoce el mecanismo inmunológico autoinmune responsable de las alteraciones gástricas y la malabsorción de vitamina B₁₂. Por un lado, las células parietales del estómago van desapareciendo progresivamente, se va configurando la gastritis atrófica que puede llegar a la atrofia gástrica cuando desaparecen todas las células parietales. En estos enfermos se demuestran anticuerpos anti células parietales y anti Factor intrínseco de tipo bloqueante, que impide la unión del FI a los receptores específicos de la mucosa ileal. Por otro lado, la etiología autoinmune, se apoya en la asociación de la enfermedad con otras enfermedades autoinmunes como tireotoxicosis, hipotiroidismo, enfermedad de Hashimoto, etc. Se ha descrito algún caso de la enfermedad durante tratamientos con interferón²⁶, también es frecuente la asociación a cáncer gástrico.

Hay una predisposición genética y racial a padecer la enfermedad.

Las manifestaciones clínicas características de la anemia perniciosa son la lengua ardiente, dolorosa y agrietada, apareciendo depapilada y roja por la glositis atrófica²⁷. Pueden aparecer también síntomas digestivos como dolor epigástrico, flatulencia y diarrea. Pueden aparecer parestesias en miembros superiores o inferiores y otros síntomas neurológicos dependientes de la mielosis funicular²⁸ que acompaña a la enfermedad. En la exploración se observa un tinte ictérico, amarillo limón. No suele haber hepato-esplenomegalia.

Se han descrito algunos casos de esta enfermedad sin anemia, estos casos se manifestaron por macrocitosis y glositis. La enfermedad se diagnostica por niveles de B₁₂ bajos, anticuerpos anti-Factor Intrínseco y excreción aumentada por la orina de grandes cantidades de ácido metilmalónico con valores superiores a 4 mg/24 horas²⁹. La excreción aumentada de metilmalónico, es patognomónica del déficit de B₁₂, permaneciendo normal si se trata solo de un déficit de folato.

Dado que esa megaloblastosis suele ser uno de los primeros indicios que hacen sospechar la existencia de un déficit de B₁₂, cualquier circunstancia que enmascare dicha megaloblastosis puede determinar que el déficit de B₁₂ pase desapercibido y, por tanto, el enfermo quede sin diagnóstico y oportuno tratamiento con lo que las manifestaciones neurológicas específicas del déficit de vitamina B₁₂ continúan su evolución llegando a ser irreversibles³⁰. Uno de los factores nutricionales que se sabe enmascara la megaloblastosis por déficit de B₁₂ es la administración de suplementos con folato. Este problema debe tenerse en cuenta cuando se instaura dicha suplementación con folato en personas con riesgo de padecer déficit de B₁₂ (ancianos y vegetarianos).

Otras causas de déficit de B₁₂:

Las enfermedades gástricas y la gastrectomía total o parcial pueden dar lugar a una anemia megaloblástica, por ausencia o disminución de Factor Intrínseco y como consecuencia déficit de vitamina B₁₂.

La vagotomía y la medicación con receptores anti H₂, inhibidores de la bomba de protones, reducen la absorción de B₁₂ y puede provocar también déficit de vitamina B₁₂ por lo que algunos autores recomiendan la suplementación vitamínica cuando se inicia el tratamiento con antiácidos³¹.

Enfermedades intestinales: Resecciones de íleon, ileítis, esprue, celiacía o parasitaciones por Botriocéfalo. El motivo es la falta de receptores ileales para el complejo B₁₂-FI, que limita su absorción.

También se produce en la *enfermedad pancreática* severa. La falta de enzimas pancreáticas impide la ruptura de la unión haptocortina-B₁₂, la vitamina B₁₂ no se puede transferir y unirse al FI, esto ocurre en el síndrome de Zollinger-Ellison, tumor generalmente pancreático, en el que se producen grandes cantidades de gastrina. Esto da lugar a grandes cantidades de CIH, lo que puede provocar malabsorción de la B₁₂ dado que se impide la transferencia desde la haptocortina al FI.

Déficit de B₁₂ por *aporte insuficiente en la dieta*, son raros en nuestro medio, no así en países cuya dieta es muy pobre en alimentos de origen animal. Los vegetarianos y lactantes de madres vegetarianas, también pueden sufrir este déficit. En caso de malnutriciones severas, pueden coexistir junto al déficit de vitamina B₁₂, déficit de hierro y folatos.

DÉFICIT SUBCLÍNICO DE VITAMINA B₁₂

Se puede decir que existe un déficit subclínico de vitamina B₁₂ cuando existe tal déficit pero no hay manifestaciones hematológicas que nos hagan pensar en el mismo. Este déficit ocurre pues sin anemia y sin alteraciones hematológicas típicas: macrocitosis y polisegmentación neutrófila.

A veces, algunos pacientes, presentan alteraciones solo demostrables electrofisiológicamente, lo que demuestra cambios neurológicos escondidos tras la apariencia de asintomáticos^{32,33}.

La principal y más grave característica de la deficiencia subclínica de B₁₂ son las alteraciones. La sintomatología neurológica (tabla 2) es inespecífica, muy variada y frecuente, pudiendo ir desde la neuropatía periférica, con disminución de la sensibilidad superficial a la más grave, la degeneración de los cordones espinales (mielosis funicular), típica de la anemia Perniciosa²⁸. Las alteraciones neurológicas periféricas, son muy frecuentes y preceden a veces a las anomalías hematológicas, empiezan de forma insidiosa y son principalmente de tipo sensitivo, parestesias o debilidad muscular.

Los desordenes mentales ligados al déficit de B₁₂ son frecuentes y pueden ser de tipo paranoide, esquizoide o depresivo. Se ha relacionado el déficit de vitamina B₁₂ con la enfermedad de Alzheimer. Con frecuencia no se piensa en esta causa que, lógicamente es preciso tomar en consideración. Así, el déficit de vitamina B₁₂, esta relacionado con un mayor riesgo de padecer depresión severa, y otros trastornos neuropsiquiátricos como agitación y estados paranoicos³⁴⁻³⁷. Mujeres con niveles bajos de B₁₂ están particularmente inclinadas a la depresión.

Hay autores que consideran que el déficit de B₁₂ multiplica por dos el riesgo de depresión severa³⁸. Sin embargo, otros autores han estudiado la depresión y su relación con la alimentación vegetariana u omnívora, y aunque la prevalencia de déficit de vitamina B₁₂ es mayor entre la población vegetariana, estos autores encuentran una menor tasa de depresión en esta población³⁹, por tanto, otros factores deben estar también implicados. También se ha relacionado el déficit de vitamina B₁₂ con la enfermedad de Alzheimer que constituye la demencia senil más frecuente en la población occidental⁴⁰.

La deficiencia de B₁₂ se ha relacionado con la aterosclerosis. La implicación de la vitamina B₁₂ en la fisiopatología de la aterosclerosis es a través de la homocisteína⁴¹. El mecanismo fisiopatológico por el que la hiperhomocisteinemia condiciona la lesión cardiovascular no está del todo esclarecido. Parece que interactúa directa y/o indirectamente sobre el proceso aterogénico, contribuyendo por una parte a la disfunción endotelial y por otra facilitando la trombogénesis. Además de la vitamina B₁₂, otras vitaminas del grupo B (Folato, B₂, B₆) pueden ser determinantes de hiperhomocisteinemia. La hiperhomocisteinemia está considerada hoy día como un factor de riesgo independiente de las enfermedades cardiovasculares, incluyendo las enfermedades coronarias y la patología cerebrovascular. Aunque en la última década se han reducido el número de muertes en números absolutos, debido a las medidas de salud pública, incluyendo aspectos nutricionales y promoción de la actividad física, para el año 2020 estas enfermedades seguirán ocupando el primer lugar de causa de muerte en los países occidentales. Una revisión sobre el papel de la homocisteína como factor de riesgo cardiovascular ha sido recientemente publicada por nuestro grupo⁴².

Metodología diagnóstica

El diagnóstico de la deficiencia de vitamina B₁₂ está basado en criterios clínicos, morfológicos y bioquímicos. Es muy importante el diagnóstico precoz, antes que las alteraciones neurológicas se hagan irreversibles, por eso en los últimos años se han ido desarrollando una serie de técnicas encaminadas al diagnóstico precoz. Entre ellas cabe destacar la holotranscobalamina II (holoTC-II), el ácido metilmalónico (AMM) y la homocisteína total (tHcy).

El diagnóstico de la deficiencia de B₁₂ permite ahora un mejor diagnóstico incluso en casos atípicos, una mayor confianza en el rechazo de casos en que no existe deficiencia y más fácil diagnóstico en casos de deficiencia subclínica⁴³.

El desarrollo del déficit de B₁₂ es lento, va acompañado de astenia, pérdida de memoria y polineuropatía^{36,37,44-47}. Pero hay que tener en cuenta que los síntomas neurológicos más o menos severos, pueden ocurrir en ausencia de anemia en una considerable proporción de pacientes³⁸.

Los síntomas inespecíficos con los que comienza el proceso, la posible ausencia de anemia y los daños en el sistema nervioso que pueden llegar a ser irreversibles cuando el diagnóstico es tardío^{48,49}, son un fuerte incentivo para establecer un adecuado diagnóstico.

Cuadro hemático periférico

La Hematimetría completa, y el examen morfológico de la sangre periférica, nos pueden ayudar mucho al diagnóstico de sospecha. El VCM se eleva, pero esto ocurre cuando la vitamina B₁₂ está por debajo de 200 pg/ml. Algunos autores como Chanarin y Metz⁵⁰, atribuyen la insensibilidad del VCM a los rangos de normalidad de la mayoría de los laboratorios, y recomiendan que volúmenes de 94 fl y superiores, sean sospechosos de déficit de B₁₂.

Niveles de B₁₂

Muchos autores han hablado sobre las limitaciones en la dosificación de la vitamina B₁₂^{2,51,52}.

Es el test más familiar, el de más bajo coste y más amplia disponibilidad, lo que ha contribuido a favorecer el papel de este test en el diagnóstico del déficit de Cobalamina, a pesar de las limitaciones en su especificidad⁵¹. y de la controversia en cuanto a su sensibilidad que es del 97% solo en caso de déficit clínico⁵¹. **Tabla III.**

Muchas son las técnicas que se han ido utilizando para medir los niveles de vitamina B₁₂, son métodos microbiológicos, isotópicos y técnicas de enzimoinmunoensayo.

Dependiendo de la técnica utilizada y del laboratorio que realice la prueba, el límite bajo de la normalidad para la vitamina B₁₂, es muy variable^{51,53,54}. Hoy utilizamos el corte tradicional de 200 pg/ml como valor de normalidad, basado en múltiples estudios en los cuales se estudian pacientes cobalamino deficientes diagnosticados por criterios clínicos y hematológicos y comparados con sujetos sanos⁵⁵. El uso para el diagnóstico de la deficiencia de la holoTC-II, del ácido metilmalónico^{50,56} y homocisteína, ha mejorado las expectativas del diagnóstico precoz, encontrándose valores patológicos incluso con niveles normales de la vitamina, se postula que la deficiencia tisular es mayor y más frecuente que la deficiencia sérica⁵⁷ de Cobalamina.

Se ha demostrado, la elevación de los metabolitos incluso con nivel normal de la vitamina. La deficiencia tisular es responsable entre otros de los desordenes neuropsiquiátricos y enfermedad tromboembólica, por lo que se recomienda la suplementación vitamínica en poblaciones de riesgo como ancianos, incluso con niveles séricos normales de las vitaminas correspondientes.

Recordar que una B₁₂ normal no excluye la deficiencia funcional de Cobalamina, por tanto, es más importante la dosificación de los metabolitos dependientes de la vitamina B₁₂, el ácido Metilmalónico y la Homocisteína.

Falsas elevaciones se han observado en los síndromes mieloproliferativos, por el contrario, valores falsamente bajos se observan en la deficiencia de folato⁵⁸, embarazo, mielomatosis y en la deficiencias de Transcobalamina. En la disbacteriosis intestinal, puede haber niveles de B₁₂ normal, por la producción por parte de las bacterias de Cobalamina biológicamente inactiva⁵⁹.

Niveles de folato sérico y eritrocitario

Se deben medir los niveles de folato, tanto sérico como intraeritrocitario, ya que pueden coexistir el déficit de folato junto a la deficiencia de vitamina B₁₂.

Ácido metilmalónico (AMM)

Aunque las elevaciones del AMM son muy específicas⁶⁰ del déficit de vitamina B₁₂, también puede aparecer elevado en la insuficiencia renal crónica^{61,62}, hipovolemia y algunos defectos metabólicos congénitos (Tabla A).

La determinación del AMM⁶³⁻⁶⁵ en suero, ha recibido una especial atención, debido a la estabilidad del AMM en sangre y la pequeña muestra necesaria⁶⁶, pero el coste elevado y la complejidad del método impiden su uso rutinario. Otros autores analizan la utilidad diagnóstica y el coste beneficio de dicha prueba⁶⁷.

La medida del AMM urinario puede estar indicado en pacientes con insuficiencia renal, para distinguir la elevación del AMM sérico propia de la insuficiencia renal de un déficit real de B₁₂⁶⁷.

Homocisteína

Es un muy buen test para el diagnóstico del déficit de Cobalamina^{51,60}. Su elevación aparece temprano y precede en el tiempo a los síntomas, aumenta cuando aumenta la deficiencia y no decrece hasta que se establece el tratamiento.

Pero tiene poca especificidad, la minoría de las elevaciones de la Homocisteína se deben al déficit de Cobalamina y en su mayoría a déficit de folato o el abuso de alcohol^{68,69}, o reflejan características personales o de hábito de vida también en enfermedades sistémicas como el Lupus, donde parece no estar recomendado el tratamiento⁷⁰ (Tabla A). Los intervalos de referencia no son universalmente aceptados⁷¹.

Tanto el AMM como la Homocisteína, se elevan con la edad, lo puede indicar el déficit subclínico de estas vitaminas en ancianos ⁷².

AMM y la Homocisteína se han mostrado muy eficaces en el diagnóstico del déficit de vitamina B₁₂, en el estudio de Stabler⁷³, usando la respuesta al tratamiento con B₁₂ como evidencia del diagnóstico, tienen elevado al menos un metabolito un 94 % de los pacientes.

En algunos pacientes, con déficit único de folato en el estudio de Savage⁶⁰, se evidenció una elevación del AMM en 15 de 123 pacientes, 11 de ellos tenían Insuficiencia renal y 3 Hipovolemia.

La utilidad del análisis de los metabolitos en las deficiencias moderadas es incierta, aunque es sabido que las elevaciones del AMM y Homocisteína preceden a los cambios hematológicos, neurológicos y a los niveles séricos bajos de B₁₂⁷⁴.

Los metabolitos, pueden dar elevaciones falsas como se ha visto en una tabla anterior, particularmente en los ancianos en que la prevalencia de niveles altos de AMM y Homocisteína es mucho mayor que los niveles bajos de B₁₂ o evidencia clínica de deficiencia^{54,75}. Esto es así por que los test no son específicos y por la deficiencia subclínica de B₁₂, folato o B₆. Por todo esto hay que tomar con precaución las elevaciones de los metabolitos sin evidencia clínica de la deficiencia^{50,56}.

Después del tratamiento de la deficiencia, los metabolitos tienden a normalizarse al cabo de 7-14 días⁷⁴.

En pacientes con deficiencia de Cobalamina, tratados con folato inapropiadamente, el AMM permanecerá alto⁹². En otros trabajos^{76,77} se sugiere que la normalización de los metabolitos después del tratamiento es una respuesta inespecífica.

Dada la importancia que está adquiriendo la determinación de la Homocisteína, se ha pensado en los posibles efectos de la fase preanalítica, sobre la determinación, parece que el éxtasis venoso prolongado provocado por el torniquete, puede provocar diferencias en los niveles de Homocisteína⁷⁸. Lo mismo cabe pensar de la postura del enfermo durante la venopunción⁷⁹, algunos autores han recomendado hacer la venopunción sin torniquete y después de 15 minutos de reposo¹⁰⁹, esto no es posible en muchos laboratorios.

Inmediatamente después de tomada la muestra ya sea de suero o anticoagulada preferiblemente con EDTA⁸⁰, las células rojas empiezan a ceder homocisteína al plasma^{81,82}, causando un incremento artificial de esta, la homocisteína aumenta un 10% por hora hasta la centrifugación, por ello para inhibir este efecto^{81,82} y tener unos resultados fiables, las muestras deben ser colocadas inmediatamente después de la extracción en un baño de hielo y centrifugar antes de una hora y por último realizar la determinación o congelar a -20°C hasta la realización de la

prueba. Añadiendo Fluoruro⁸⁴ o ácido cítrico⁸⁵, a las muestras de sangre, también se controla el problema.

Las causas que alteran las determinaciones de Cobalamina y sus metabolitos la homocisteína y el AMM. Las podemos consultar en la **tabla V**

Holotranscobalamina II

La mayoría de la Cobalamina circula en la sangre unida a la Transcobalamina I, llamada Haptocorrina que no libera Cobalamina a los tejidos, es de más interés una pequeña fracción de Cobalamina que se une a la Transcobalamina II, es la llamada Holotranscobalamina II que sí libera Cobalamina para su uso a los tejidos. Recientes estudios han demostrado que el descenso de la Holotranscobalamina II es un marcador temprano del déficit^{86,87}, mientras que otros⁸⁸, en estudios sobre ancianos, dicen lo contrario. Todo esto debe ser más documentado. La especificidad de los niveles bajos puede ser limitada, puede estar baja en el déficit de vitamina B₁₂ y cuando hay un incremento de utilización de la Holo-TC II, como ocurre cuando hay hiperplasia eritroide⁸⁹.

Hay métodos radioisotópicos y los nuevos de inmunoanálisis^{82,90}, alguno comercializado⁹⁰, considerando como valores normales los superiores a 50 pmol/L⁹¹. Es pronto para determinar si el uso de la Holotranscobalamina II tiene ventajas en el diagnóstico del déficit de Cobalamina⁹², aunque parece que la Holotranscobalamina II baja, es un signo temprano del balance negativo de B₁₂⁶, frecuentemente no asociado a alteraciones hematológicas⁸.

Valores normales o altos de B₁₂ y bajos de Holo-TC cursan con anemia megaloblástica y alteraciones neurológicas, es la deficiencia hereditaria de Transcobalamina II⁹³.

Pepsinógeno A y C sérico:

Junto con la gastrina, son indicadores de atrofia gástrica ^{2,,94,95}.

Gastrina sérica:

Niveles altos están presentes en el 80-90 % de los pacientes de Anemia perniciosa^{55,96}, puede elevarse en pacientes con diferentes grados de gastritis atrófica que pueden tener malabsorción de B₁₂ unida a proteínas, el test limita su especificidad y sensibilidad para detectar anormalidades gástricas subclínicas^{97,98}.

Anticuerpos anti-células parietales:

Pueden tener un papel importante en la etiopatogenia de la gastritis autoinmune de la Anemia Perniciosa⁹⁹. Están presentes en el 85 % de los pacientes con anemia perniciosa^{55,100}, pero no son específicos, pues pueden estar presentes en otros procesos autoinmunes y en un 3-10 % de personas sanas, dependiendo de la edad¹⁰¹.

Anticuerpos anti-Factor Intrínseco:

Son menos específicos que los anteriores, solo están presentes en la mitad de los caso de Anemia Perniciosa^{55,102}. Es raro encontrarlos en pacientes sanos o con otras enfermedades autoinmunes¹⁰³, se han visto en algunos pacientes con enfermedad de Graves, en tales casos se encuentra una gastritis atrófica con producción normal de FI¹⁰⁴.

Médula ósea

Generalmente no es necesario este examen para el diagnóstico⁴⁴, pero en algún estudio se ha hecho para identificar la enfermedad en pacientes con alteraciones neurológicas sin anemia³⁸.

El aspirado de médula ósea, es muy rico en pulpa medular, observándose un predominio de la serie roja, que puede representar el 40-60% de los elementos nucleados de la médula. Es típica la presencia de megaloblastos, eritroblastos de gran tamaño de citoplasma a menudo muy basófilo y núcleo inmaduro, son frecuentes las mitosis, muchas veces se observa asincronismo madurativo núcleo-citoplasma. La hemopoyesis megaloblástica es la responsable de la eritropoyesis ineficaz y de la hemólisis periférica.

Se han publicado casos en que la médula se podía confundir con una leucemia aguda, que regresó inmediatamente tras tratamiento con vitamina B₁₂⁵¹.

La serie mielopoyética, también muestra un gigantismo celular. Los megacariocitos son muy grandes y segmentados. Es muy válida para el diagnóstico ^{2,105}.

Cuadro bioquímico

La hemólisis acelerada de los hematíes macrocíticos da lugar a una hiperbilirrubinemia indirecta y a un incremento de la LDH, sobre todo la isoenzima LDH₁. No es infrecuente la Hipersideremia.

La eritropoyesis ineficaz está provocada por: un tiempo de síntesis del DNA prolongado y por el aborto eritroblástico intramedular, con un aumento de la fagocitosis por los histiocitos de los eritroblastos patológicos.

Test de síntesis de la Timidina:

La prueba mide la incorporación de la timidina radiactiva al DNA celular, la preincubación de las células con deoxiuridina suprime dicha incorporación. En la deficiencia de folatos se impide la conversión del deoxiuridilato en deoxitimidilato, con lo que la prueba saldrá alterada. La deficiencia de vitamina B₁₂ provoca una disminución del metiltetrahidrofolato, con lo que la prueba se altera de forma similar. La adición de vitaminas in vitro y el estudio de si corrigen o no la prueba, permiten diferenciar ambos procesos, es un test muy sensible en el diagnóstico de la anemia megaloblástica, por déficit de folato o de vitamina B₁₂¹⁰⁶. Utiliza médula ósea y es difícil de estandarizar por lo que es raramente usado ^{50,106}.

Las determinaciones del ácido 2-Metilcítico I y II¹⁴⁸ y Cistationina sérica ¹⁰⁷ pueden utilizarse en el diagnóstico, aunque son técnicas no utilizadas de rutina.

Una vez identificado el déficit en B₁₂, hay que identificar la causa del déficit, obviar este paso puede significar un error diagnóstico grave, no olvidemos que en algunos casos el déficit puede ir acompañado de un cáncer gástrico.

Estudio de Absorción de B₁₂: Test de Schilling:¹¹⁰

Se administra Cobalamina marcada con cobalto radiactivo, si se demuestra carencia de absorción, se repite la prueba administrando Cobalamina y Factor intrínseco, si se corrige la malabsorción, el problema está en el F.I. y estamos ante una anemia perniciosa, si no se corrige el problema es de origen intestinal.

Paso 1:

Se da una dosis de B₁₂ cristalina por boca va marcada con cobalto radioactivo y se mide la cantidad de Cobalamina eliminada en orina de 24 horas. Si el resultado es anormal se pasa a:

Paso 2:

Se realiza una semana después y se da Cbl marcada con cobalto y FI.

La interpretación del test la vemos en la tabla IV

La elevación de los niveles de Cobalamina tras tratamiento oral, diagnostica la ausencia de malabsorción y el déficit de Transcobalamina I, que es responsable del 15% de las deficiencias de Cobalamina ¹¹¹.

Estudio de la patología gástrica:

- Aclorhidria resistente a la estimulación con histamina
- Ausencia de Factor Intrínseco en el jugo gástrico
- Anticuerpos anti-F.I
- Anticuerpos anti células parietales

Prueba terapéutica:

Algunas veces, a pesar de estas determinaciones, el diagnóstico es dudoso y se recurre a la prueba terapéutica con B₁₂ parenteral. Después de iniciado el tratamiento, el VCM tiende a aumentar en los primeros 3-4 días, presumiblemente por causa de la reticulocitosis, después decrece hasta alcanzar los rangos de normalidad en 25-78 días⁸¹.

Hay que tener varias cosas en cuenta:

- 1.- La respuesta al tratamiento puede ser escasa o nula si se asocia un déficit de hierro o a otra enfermedad crónica que disminuya la respuesta reticulocitaria.
- 2.- Los resultados pueden ser ambiguos en pacientes con anemia media, no hay que olvidar que la respuesta es proporcional al grado de anemia ⁵⁵.
- 3.- El tratamiento con folato en pacientes con déficit de Cobalamina, puede mejorar los parámetros hematológicos, pero el daño neurológico sigue y por el contrario tratamiento con B₁₂ en pacientes con déficit de folato no causa mejoría hematológica alguna ¹¹².

Resonancia Magnética:

En los últimos tiempos, se utiliza esta técnica para el diagnóstico del déficit de Cobalamina¹¹³. La imagen puede identificar pacientes con deficiencia de Cobalamina con síntomas neurológicos y parámetros hematológicos normales y puede ser utilizado para constatar la mejoría de las alteraciones neurológicas tras tratamiento específico¹¹⁴.

Estrategia diagnóstica del paciente:

Naturalmente no todos los test hay que hacerlos a todos los pacientes, aunque no existe un diagnóstico estándar en cada paciente y según el contexto clínico hay que seguir una estrategia determinada, se requieren resultados anormales en un mínimo de dos test, estos no deben ser subsidiarios de dar falso negativo por los mismos motivos, por ejemplo la Homocisteína y el AMM que se elevan en la insuficiencia renal, lo mismo ocurre con la Cobalamina y la Holotranscobalamina II que hablan de la Cobalamina circulante, una combinación aceptable es holoTC-II y homocisteína, podemos ver las estrategias en varios casos tipo:

En pacientes con síntomas y signos típicos de la enfermedad, como son la anemia megaloblástica y la neuropatía, está indicada la Cobalamina sérica, donde la posibilidad de un nivel normal falso es de un 2,9% de los casos⁵¹ de pacientes con deficiencia clínica manifiesta.

Los niveles de Cobalamina pueden ser falsamente bajos en la deficiencia de folato⁵⁵, esclerosis múltiple¹¹⁵ y en la infección por HIV y el déficit real debe ser diagnosticado por el aumento del AMM o de la tHcy o descenso de la holoTC-II. Por otro lado en estos enfermos los niveles bajos de Cobalamina son un signo de mal pronóstico¹¹⁶ atribuidos al bajo conteaje de células blancas factor asociado a la enfermedad avanzada¹¹⁷.

Una vez hecho el diagnóstico hay que buscar la causa, la malabsorción explica el 90% de los casos de deficiencia clínica^{55,118}. Se ha publicado malabsorción de B₁₂ unida a proteínas procedente de los alimentos y absorción normal de la Cobalamina libre.

En pacientes con anemia o problemas neurológicos de naturaleza incierta. El dilema principal se presenta cuando los niveles de cobalamina son normales⁸³, en estos casos hay que hacer test metabólicos (AMM y Homocisteína).

En pacientes con causa conocida para déficit de Cobalamina, enfermedad ileal, enfermedad gástrica, infección por el *Helicobacter pylori*¹⁶⁵ y vegetarianos. Hay que hacer test metabólicos porque la anormalidad de estos preceden a los niveles de Cobalamina bajos y a los signos y síntomas de la enfermedad^{51,120,121}.

En pacientes asintomáticos en que se encuentra accidentalmente unos niveles de Cobalamina bajos u otras anormalidades bioquímicas, se realiza de elección el AMM que estará elevado precediendo incluso al aumento de Homocisteína⁵⁴.

Factores que afectan los niveles de vitamina B₁₂:

Envejecimiento:

Con el aumento de la edad, las concentraciones de vitamina B₁₂, van disminuyendo, mientras que las del AMM, van aumentando. Los factores que contribuyen a estos cambios, son la disminución de la acidez gástrica, la presencia de gastritis atrófica y la pérdida de vitamina B₁₂ de los depósitos hepáticos¹²².

En un reciente estudio se ha publicado que la incidencia de déficit de B₁₂ en ancianos es del 5-15%, diagnosticados por elevación del AMM y baja o normal vitamina B₁₂^{25,54}, la Homocisteína suele estar

elevada y ambos AMM y Homocisteína bajan cuando se inicia el tratamiento con B₁₂¹²³.

Desde el inicio de la fortificación con folato un gran problema se ha presentado y es que aunque el folato sérico ha aumentado en la población^{124,125} y los niveles de Homocisteína tienden a disminuir¹²⁵ con el consiguiente potencial beneficio en la prevención de la enfermedad vascular¹²⁶, también se enmascara el déficit clínico y subclínico del déficit de vitamina B₁₂^{127,128}.

Tabaco:

Se ha demostrado, un aumento de la excreción urinaria de vitamina B₁₂ en fumadores¹²⁹, otros autores no encuentran diferencias significativas en los niveles de vitamina B₁₂, entre fumadores y no fumadores.

Sexo:

Algunos autores, demuestran niveles de B₁₂, mayores en hombres que en mujeres¹³⁰⁻¹³², mientras que otros no encuentran diferencias significativas entre los dos géneros^{133,134}.

Vitamina C:

Las dosis elevadas de vitamina C, parecen afectar la dosificación de vitamina B₁₂ por radioinmunoensayo¹³⁵, aunque parece que la absorción nutricional no se afecta.

Fibra:

La fibra no afecta la absorción de vitamina B₁₂¹³⁶.

Dieta vegetariana:

Es conocida la gran prevalencia del déficit de vitamina B₁₂, entre la población vegetariana, mientras que en esta la ingesta de folato supera en mucho la recomendada (RDA), la ingesta de B₁₂, es inadecuada o ausente^{137,138}. Ya hemos comentado que solo los alimentos de origen animal¹³⁹, son capaces de aportar vitamina B₁₂ al organismo.

La deficiencia de Cobalamina de origen nutricional se puede desarrollar en vegetarianos estrictos^{139,140}, ovolactovegetarianos¹⁴¹⁻¹⁴³ y en hijos de madres vegetarianas^{140,144-147}, en estos niños se han observado alteraciones neurológicas¹⁴⁸.

Recientes estudios, han demostrado el déficit funcional de Cobalamina con niveles normales de B₁₂ en suero y sin alteraciones morfológicas¹⁴⁹.

Trastornos neuropsiquiátricos, pueden desarrollarse en ausencia de macrocitosis y/o anemia⁵⁶, a menudo la macrocitosis puede estar enmascarada por coexistir junto al déficit de vitamina B₁₂, ferropenia, por otro lado frecuente entre individuos vegetarianos^{56,149}.

La noción de que los vegetarianos, están protegidos de la enfermedad cardiovascular está muy extendida. La dieta vegetariana, modifica favorablemente varios factores de riesgo¹⁵⁰⁻¹⁵³, disminuyendo los riesgos y la mortalidad por enfermedad coronaria¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Sin embargo, insuficiencia o ausencia de alimentos de origen animal, origina una alteración en el balance de la salud. La disminución en la ingesta de carne, pollo, pescado, origina una deficiencia de vitamina B₁₂. La temprana manifestación de la deficiencia de Cobalamina, es el incremento de la Homocisteína¹⁵⁷ conocido como un factor de riesgo independiente de la enfermedad cardiovascular¹⁵⁸, por otro lado la autoxidación de la Homocisteína estimula la peroxidación lipídica, la formación de productos proteicos oxidativos (AOPPs Advanced Oxidation Protein Products)¹⁵⁹ y productos finales de la glicosilación (AGEs Advanced Glycation end Products)^{160,161}, que están implicados en la patogénesis de algunas enfermedades degenerativas e inflamatorias incluyendo a la arteriosclerosis¹³⁷, la Homocisteína se eleva antes que disminuya la hemoglobina o el hematocrito.

La hiperhomocisteinemia se ha demostrado en niños que se alimentan de dietas macrobióticas y en niños nacidos de madres vegetarianas¹⁶² y en adultos vegetarianos¹⁶³.

En segundo lugar, la exclusión de la dieta del pescado da lugar a una disminución de ácidos grasos n-3 que induce a un aumento en el riesgo de enfermedad cardíaca, se ha demostrado que la ingesta regular de pescado está asociada a una disminución en el riesgo de enfermedad coronaria^{164,165}, los ácidos grasos n-3 y el aceite de pescado EPA (20:5, n-3) y DHA (22:6, n-3), parecen los responsables de este efecto beneficioso^{166,167}. Su deficiencia incrementa la agregación plaquetaria y consecuentemente el riesgo de trombosis. Por lo que la dieta vegetariana, puede considerarse un factor de riesgo de enfermedad¹⁶⁸.

Tratamiento:

Tradicionalmente, se recomienda el tratamiento con vitamina B₁₂ intramuscular^{169,170}, pero desde hace tiempo, se ha visto que el tratamiento oral es también efectivo²⁰⁻²². Entre 1950 y 1960, varios investigadores¹⁷¹⁻¹⁷⁴, demuestran una vía adicional que no requiere de Factor Intrínseco o de un Ileón intacto^{171,174-176} y si de grandes cantidades de cianocobalamina, del orden de 100 a 100.000 µg. De estas dosis que se dan a los pacientes por vía oral, aproximadamente el 1% se absorbe, lo que excede el requerimiento diario de la vitamina. Otros autores, demuestran unos resultados hematológicos excelentes en pacientes con anemia perniciosa con dosis de 300 a 2000 µg de cianocobalamina oral^{171,174}. Estos pacientes con dosis de mantenimiento de 1000 µg/día, no padecen recaídas neurológicas ni hematológicas y las concentraciones de Cobalamina permanecen normales^{173,174,177}.

En estudios más recientes^{178,179}, pacientes con deficiencia de Cobalamina, se seleccionan en dos grupos de tratamiento, con cianocobalamina intramuscular y oral respectivamente, viendo los cambios neurológicos, hematológicos y los cambios en los niveles de Cobalamina, Metilmalónico y Homocisteína, indicadores más sensibles de la deficiencia de Cobalamina^{41,60,180}. En este estudio, se demostró nuevamente la eficacia del tratamiento oral, tan efectivo como el intramuscular. Las grandes dosis de Cobalamina oral, no parece ser tóxicas¹⁸¹.

El tratamiento intramuscular es más caro, por necesitar enfermería¹⁸², menos agradable para el enfermo y presenta algunas complicaciones como la alergia al medicamento e hiperpigmentación¹⁸³. Por otro lado el tratamiento intramuscular de mantenimiento, es interrumpido por el paciente, mientras que el oral es más fácilmente mantenible¹⁸⁴.

Últimamente se ha descrito también como efectiva la vía oral sublingual¹⁸⁵ e intranasal

Nosotros utilizamos la Cobalamina intramuscular, sobre todo si hay alteraciones neurológicas o anemia grave, en dosis de 1mg en días alternos durante 10 días, seguido de 1mg a la semana durante 10 semanas y terminamos con una dosis de mantenimiento de 1mg al mes.

Prevención:

Esta indicada la suplementación alimenticia, especialmente en poblaciones de riesgo; ancianos, vegetarianos y niños nacidos de madres vegetarianas⁵⁷.

Nuevas ingestas recomendadas:

Como medicina preventiva en la salud pública, nacen una serie de recomendaciones encaminadas a esta consecución, son las nuevas ingestas de referencia (DRI)¹⁸⁶ promulgadas por algunos organismos oficiales. Para elaborar estas recomendaciones, se tienen en cuenta factores fisiológicos como la edad, sexo, gestación y lactancia, además de otros factores medioambientales y del estilo de vida, en esto último, tiene especial relevancia las dietas ovolactovegetarianas y las vegetarianas estrictas.

Enriquecimiento de alimentos:

Desde la introducción de la fortificación con folato en USA en 1998, ha habido una drástica disminución de la deficiencia de folato e hiperhomocisteinemia²⁶⁶. Esto ha contribuido a un sustancial cambio en el riesgo proporcional atribuible al folato o a la vitamina B₁₂ como causas de hiperhomocisteinemia^{116,123}.

Hay que vigilar especialmente entre los ancianos la deficiencia de B₁₂, ya que esta puede verse enmascarada²³⁶, sobre todo sus manifestaciones hematológicas con la fortificación generalizada entre la población con folato²³⁷ lo que da lugar a un aumento en el daño neurológico por deficiencia de Cobalamina no diagnosticada a tiempo^{237,238}.

La gran prevalencia del déficit de vitamina B₁₂, sobre todo entre la población de ancianos y los vegetarianos, hace muy importante el diagnóstico precoz por métodos bioquímicos, clínicos o por las anomalías hematológicas. Como métodos más útiles en el diagnóstico precoz de este déficit, cabe destacar las determinaciones de tHcy, AMM y HoloTC-II.

Valoramos positivamente el costo-beneficio que suponen estas nuevas técnicas, teniendo en cuenta que sí el diagnóstico es tardío, las alteraciones neurológicas serán irreversibles, aunque las alteraciones hematológicas remitan. Por último recomendar a poblaciones de riesgo, el aumento de la ingesta de vitamina B₁₂ utilizando productos alimenticios fortificados o suplementación vitamínica.

Conclusiones:

El diagnóstico temprano y preciso del déficit de vitamina B₁₂ es imprescindible en la población general, pero cobra especial importancia en poblaciones de riesgo; ancianos, vegetarianos y niños nacidos de madres vegetarianas.

Como método diagnóstico, la vitamina B₁₂, se muestra como un parámetro poco eficaz, siendo recomendadas las determinaciones de HoloTC-II y tHcy.

No hay que olvidar la frecuente asociación a deficiencia de ácido fólico y vitamina B₆.

El mejor tratamiento es el preventivo, la fortificación alimenticia debería estar regulada como en otros países.

TABLAS Y FIGURAS:
Figura I: Vitamina B₁₂

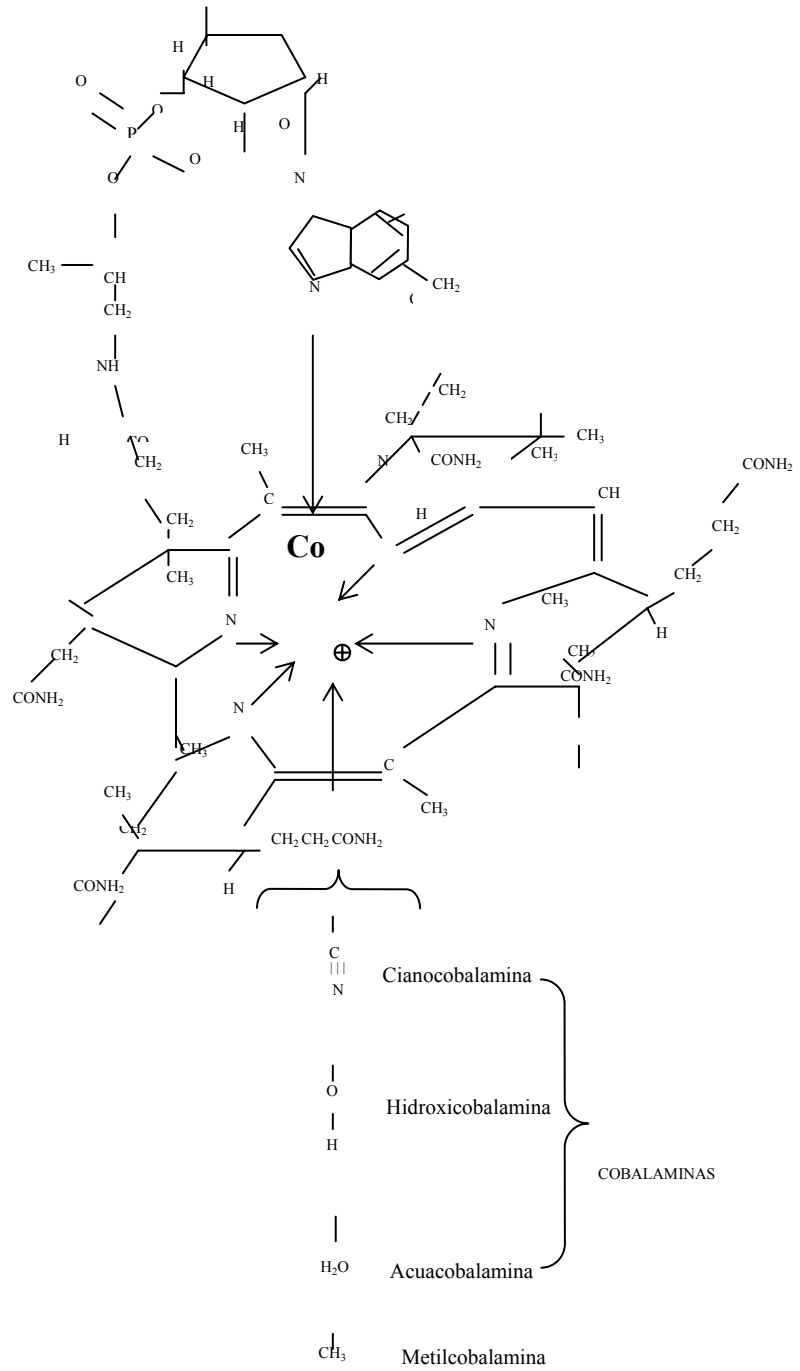


Tabla I: Contenido en B₁₂ de los alimentos en microgramos

Leche fluida de vaca	0.86
Leche en polvo entera reconstituida	0.65
Leche evaporada reconstituida	0.19
Yogour	1.34
Huevo de gallina	0.65
Carne de ternera	8.28
Carne de ave	1.38
Carne de carnero	10.17
Carne de cerdo	3.68
Hígado de ternera	60.95
Hígado de pollo	22.31
Corazón de cerdo	4.37
Corazón de res	14.95
Corazón de pollo	8.40
Riñón de ternera	21.85
Riñón de cerdo	8.05
Molleja de pollo	2.19
Pescado	0.96
Carne picada	2.48
Masa cárnica	0.69

:

Tabla II: Trastornos neurológicos asociados a la deficiencia de B₁₂.

Degeneración combinada de los cordones espinales. Mielosis funicular		
Cordones posteriores	C. Laterales	Tracto espinotalámico
Acroparesias	Debilidad o Paraplejía	Calambres
Incoordinación motora	Marcha espástica	Crisis abdominales tipo tabético
Síndrome de L'Hermitte	↑ Reflejos tendinosos	
↓ Sensibilidad vibratoria	Babinski positivo	
Ataxia sensitiva		
↓ Reflejos tendinosos		
Alteraciones cerebrales: Demencia Desorientación Apatía Irritabilidad Depresión Psicosis		
Alteraciones de los nervios craneales: Disminución de la visión (nervio óptico) Alteraciones del olfato y el gusto		
Neuropatía periférica: Perdida de la sensibilidad superficial Acroparesias Perdida de la sensibilidad vibratoria Disminución de los reflejos tendinosos		

Tabla III: Causas de deficiencia de B₁₂.

Alimentarias (Disminución del aporte) Vegetarianos. Nacidos de madres vegetarianas	
Disminución de la Absorción	
Causa Gástrica	Causa intestinal
Anemia perniciosa del adulto	Defecto congénito de absorción ileal de B ₁₂
<i>Anemia perniciosa congénita infantil</i>	Anemia perniciosa infantil con albuminuria
Gastrectomía total o parcial	Infestaciones por Botriocéfalo
Gastritis atrófica	Diverticulosis intestinal
Factor Intrínseco anormal	Fístulas intestinales
	<i>Síndrome del asa ciega</i>
	<i>Estenosis intestinal</i>
	Esclerodermia
	<i>Resección ileal</i>
	Enfermedad de Crohn
	Enfermedad pancreática severa
	Ileítis
	<i>Enfermedad celíaca</i>
	Espúe tropical
	Síndrome de Zollinger-Ellison
	Tratamientos con colchicina
	Tratamientos con PAS
	Tratamientos con neomicina
	Tratamientos con cloruro potásico
Defectos en la Transcobalamina II	
Metabolismo y utilización celular anormales	
Anestesia con óxido nítrico	
Defectos metabólicos congénitos	
Anticonceptivos orales	
Diálisis renal	
SIDA	
Deficiencia severa de hierro	
Altas dosis de ácido Ascórbico	
Neoplasias	

Tabla IV: Interpretación del test de Schilling

Paso I Normal	Paso I anormal II Normal	I y II anormales
Deficiencia dietética	Anemia Perniciosa	Anemia Perniciosa, recogida de muestra inadecuada en paso II
Hipoclorhidria	Gastrectomía	Insuficiencia renal ^{132,133}
Gastrectomía parcial	By-pass gástrico	Recogida inadecuada de la orina en ambos pasos
	Ausencia congénita o disfunción del FI	Crecimiento bacteriano exagerado
	Recogida de orina inadecuada en el paso ¹³¹	Infección por la tenia del pescado
		Insuficiencia pancreática.
		PAS, Colchicina, Neomicina, anticonvulsivantes ²⁰¹
		Síndrome de Zollinger-Ellison

Tabla V: causas que alteran los niveles de B₁₂, AMM y tHcy

Causas a parte del déficit de Cobalamina que pueden alterar las determinaciones de Cobalamina AMM y Homocisteína		
COBALAMINA	AMM	HOMOCISTEINA
<ul style="list-style-type: none"> • Idiopática • Embarazo • Déficit de TC-I • Enf asociadas (infección, HIV, Mieloma) • Déficit folato 	<ul style="list-style-type: none"> • IRC • Deshidratación • Infancia • Defectos enzimáticos • deficiencia en mutasa) 	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra incorrecta • Procesamiento incorrecto • Déficit de folato • Edad, sexo, estilo de vida • Déficit de B6

<ul style="list-style-type: none"> • Medicamentos (anticonvulsivantes, anticonceptivos orales) • Error laboratorio 	<ul style="list-style-type: none"> • Contaminación bacteriana • Error laboratorio 	<ul style="list-style-type: none"> • Hipotiroidismo • IRC • Medicamentos (isoniacida) • Enfermedades (leucemia) • Errores metabólicos • Error laboratorio
--	---	---

Bibliografía:

- 1.-Stabler SP, Lindenbaum J, Allen RH. Vitamin B-12 deficiency in the elderly: current dilemmas. *Am J Clin Nutr* 1997;66:739-40.
- 2.-Snow CF. Laboratory diagnosis of vitamin B₁₂ and folate deficiency. *Arch Intern Med* 1999;159:1289-1298.
- 3.-Tudhope GR, Swan HT, Spray GH. Patient variation in pernicious anaemia, as shown in a clinical trial of cyanocobalamin, hydroxycobalamin and cyanocobalamin-zinc tannate. *Br J Haematol* 1967;13:216-228.
- 4.-Watanabe F, Takenaka S, Kittaka-katsura H, Ebara S, Miyamoto E. Characterization and bioavailability of vitamin B₁₂-compounds from edible algae. *J Nutr Sci Vitaminol* 2002;48:325-31.
- 5.-Kittuka-Katsura H, Ebara S, Watanabe F, Nakano Y. Characterization of corrinoid compounds from a Japanese black tea (Batabata-Cha) fermented by bacteria. *J Agric Food Chem* 2004;52:909-11.
- 6.- Koop H. Review article: metabolic consequences of long-term inhibition of acid secretion by omeprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 1992;6:399-406.
- 7.-Schilling RF. The role of the pancreas in vitamin B-12 absorption. *Am J Hematol* 1983;14:197-199.
- 8.-Herzlich B, Herbert V. Depletion of serum holotranscobalamin II. An early sign of negative vitamin B₁₂ balance. *Lab Invest* 1988;58:332-337.
- 9.-Gimsing P, Nexø E. Cobalamin-binding capacity of haptocorrin and transcobalamin: age-correlated reference intervals and values from patients. *Clin Chem* 1989;35:1447-1451.
- 10.-Hamaka N, Nieman P, Canellos G, Lazerson J. Neonatal megaloblastic anemia due to inherited transcobalamin II deficiency in two sibling. *N Engl J Med* 1971;285:1163.
- 11.-Carmel R, Herbert V. Deficiency of vitamin B₁₂ binding alpha globulin in two brothers. *Blood* 1969;33:1.
- 12.-Kato N, Narita Y, Kamohara S. Liver vitamin B₁₂ levels in chronic liver diseases. *J Vitamin* 1959;5:134-140.

- 13.-Stahlberg KG, Radner S, Norden A. Liver B₁₂ in subjects with and without vitamin B₁₂ deficiency. A quantitative and qualitative study. *Scand J Haematol* 1967;4:312-330.
- 14.-Adams JF, Boddy K, Douglas AS. Interrelation of serum vitamin B₁₂, total body vitamin B₁₂, peripheral blood morphology and the nature of erythropoiesis. *Br J Haematol* 1972;23:297-305.
- 15.-Grasbeck T, Nyberg W, Reizenstein P. Biliary and fecal vitamin B₁₂ excretion in man. An isotope study. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958;97:780-784.
- 16.-Adams JF. The measurement of the total assayable vitamin B₁₂ in the body. In: Heinrich HC, ed. *Vitamin B₁₂ und Intrinsic Factor*. Stuttgart, Germany: Ferdinand Enke. Pp. 397-403.
- 17.-Adams JF. Correlation of serum and urine vitamin B₁₂. *Br Med J* 1970;1:138-139.
- 18.-Heinrich HC. Metabolic basis of the diagnosis and therapy of vitamin B₁₂ deficiency. *Semin Hematol* 1964;1:199-249.
- 19.-Reizensteins P, Ek G, Matthews CM. Vitamin B₁₂ kinetics in man. Implications on total-body B₁₂ determinations, human requirements, and normal and pathological cellular B₁₂ uptake. *Phys Med Biol* 1966;11:295-306.
- 20.-Reizensteins P. Excretion of non-labeled vitamin B₁₂ in man. *Acta Med Scand* 1959;165:313-320.
- 21.-Mollin DL, Ross GI. The vitamin B₁₂ concentrations of serum and urine of normal and patients with megaloblastic anaemias and other diseases. *J Clin Pathol* 1952;5:129-139.
- 22.-Amin S, Spinks T, Ranicar A, Short MD, Hoffbrand AV. Long-term clearance of (⁵⁷Co) cyanocobalamin in vegan and pernicious anaemia. *Clin Sci* 1980;58:101-103.
- 23.-Boddy K, Adams JF. The long-term relationship between serum vitamin B₁₂ and total body vitamin B₁₂. *Am J Clin Nutr* 1972;25:395-400.
- 24.-Rabinowitz AP, Sacks Y, Carmel R. Autoimmune cytopenias in pernicious anemia: a report of four cases and review of the literature. *Eur J Haematol* 1990;44:18-23.

- 25.-A Metz J, Bell AH, Flicker L, Bottiglieri T, Ibrahim J, Seal E, Schultz D. The significance of subnormal serum vitamin B₁₂ concentration in older people: a case control study. *J Am Geriatr Soc* 1996;44:1355-61.
- 26.-Borgia G, Raynaud L, Gentile J, Borrelli F, Cerini R, Ciampi R, Piazza M. Pernicious anemia during IFN-alpha treatment for chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res* 2003;23(1):11-2.
- 27.-Petavy-Catala C, Fontes V, Gironet N, Huttenberger B, Lorette G, Vaillant L. Clinical manifestations of the mouth revealing Vitamin B12 deficiency before the onset of anemia. *Ann Dermatol Venereol* 2003;130:191-4.
- 28.-Bottiglieri T. Folate, vitamin B₁₂, and neuropsychiatric disorders. *Nutr Rev* 1996;54:382-90.
- 29.-Gompertz D, Hoffbrand AV. Methymalonic aciduria. *Br J Haematol* 1970;18(4):377-81.
- 30.-Carmel R. Prevalence of undiagnosed pernicious anemia in the elderly. *Arc Intern Med.* 1996;156:1097-100.
- 31.-Force RW, Mecker AD, Cady PS, Culbertson VL, Force WS, Kelley CM. Ambulatory care increased vitamin B12 requirement associated with chronic acid suppression therapy. *Ann Pharmacother* 2003;37:1730.
- 32.-Karnaze DS, Carmel R. Neurological and evoked potential abnormalities in subtle cobalamin deficiency states, including those without anemia and with normal absorption of free cobalamin. *Arch Neurol.* 1990;47:1008-1012.
- 33.-Carmel R, Gott PS, Waters CH, et al. The frequently low cobalamin levels in dementia usually signify treatable metabolic, neurologic and electrophysiologic abnormalities. *Eur J Haematol.* 1995;54:245-253.
- 34.-Hector M, Burton JR. What are the psychiatric manifestations of vitamin B₁₂ deficiency?. *J Am Geriatr Soc* 1988;36:1105-1112.
- 35.-Beck WS. Neuropsychiatric consequences of cobalamin deficiency. *Adv Intern Med* 1991;36:33-56.
- 36.-Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JCM, Garrett TJ, Podell ER. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 1988;318:1720-1728.

- 37.-Zucker DK, Livingston RL, Nakra R, Clayton P. B₁₂ deficiency and psychiatric disorders case-report and literature review. *Biol Psychiatry* 1981;16:197-205.
- 38.-Pennix BW, Geralnik JM, Ferrucci L, Freíd LP, Allen RH, Stable SP. Vitamin B(12) deficiency and depression in physically disabled older women: epidemiologic evidence from the Women's Health and aging study. *Am J Psychiatry* 2000;157(5):715-21.
- 39.- Rodriguez Jimenez J, Rodriguez JR, Gonzalez MJ. Indicators of anxiety and depression in subjects with different kinds of diet: vegetarians and omnivores] *Bol Asoc Med P R* 1998;90(4-6):58-68.
- 40.-Mens W, Muller-Thomsen T, Meier-Baumgartner HP. Subnormal serum vitamin B12 and behavioural and psychological symptoms in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2000;15(5):415-8.
- 41.-Green R, Miller JW. Folate deficiency beyond megaloblastic anemia: hiperhomocysteinemia and other manifestations of dysfunctional folate status. *Semin hematol* 1999;36:47-64.
- 42.- Marcela González-Gross , Ricardo Sola, Klaus Pietrzik, Manuel J. Castillo. Homocisteína y patología cardiovascular.
- 43.- Carmel R. Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu Rev Med.* 2000;51:357-375.[CrossRef][Medline]
- 44.-Long ER. Thomas Addison and his discovery of idiopathic anemia. *Ann Med* 1935;7:130-132.
- 45.-Lindenbaum J, Pezzimenti JF, Shea N. Small-intestinal function in vitamin B₁₂ deficiency. *Ann Intern Med* 1974;80:326-331.
- 46.-Levitt AJ, Karlinsky H. Folate, vitamin B₁₂ and cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. *Acta Psychiatr Scand* 1992;86:301-305.
- 47.-Regland B, Gottfries C. Vitamin B₁₂-brist – inte minst ett neuropsykiatrisk problem. *Läkartidningen* 1992;89:2736-2740.
- 48.-Healton EB, Savage DG, Brust JCM, Garrett TJ, Lindenbaum J. Neurologic aspects of cobalamin deficiency. *Medicine* 1991;70:229-245.
- 49.-Martin DC, Francis J, Protetch J, Jacob Huff F. Time dependency of cognitive recovery with cobalamin replacement: report of a pilot study. *J Am Geriatr Soc* 1992;40:168-172.

- 50.-Chanarin I, Metz J. Diagnosis of cobalamin deficiency: the old and the new. *Br J Haematol* 1997;97:695-700.
- 51.-Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, Allen RH. Diagnosis of cobalamin deficiency: II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol*. 1990;34:99-107.
- 52.-Amos RJ, Dawson DW, Fish DI, Leeming RJ, Linnell JC. Guidelines on the investigation and diagnosis of cobalamin and folate deficiencies. *Clin Lab Haematol* 1994;46:101-15.
- 53.-Norman EJ, Morrison JA. Screening elderly populations for cobalamin (vitamin B12) deficiency using the urinary methylmalonic acid assay by gas chromatography mass spectrometry. *Am J Med* 1993;94:589-594.
- 54.-Pennypacker LC, Allen RH, Kelly JP, et al. High prevalence of cobalamin deficiency in elderly out-patients. *J Am Geriatr Soc* 1992;40:1197-1204.
- 55.-Chanarin I. *The Megaloblastic Anaemias*. 2nd ed. Oxford, England. Blackwell Scientific Publishers:1979.
- 56.-Green R. Screening for vitamin B12 deficiency: caveat emptor. *Ann Intern Med* 1996;124:509-511.
- 57.-Hans J Naurath, Etienne Joosten, Reiner Riezler, Sally P Stabler, Robert H Allen, John Lindenbaum. Effects of vitamin B12, folate, and vitamin B6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. *Lancet* 1995; 85-89.
- 58.-Lindenbaum J, Allen RH. Clinical Spectrum and diagnosis of folate deficiency. In: Bailey LB. Ed. *Folate in Health and Disease*. New York. NY: Marcel Dekker Inc 1995;43-73.
- 59.-Murphy MF, Sourial Na, Burman JF, et al. Megaloblastic anaemia due to vitamin B12 deficiency caused by small intestinal bacterial overgrowth: possible role of vitamin B12 analogues. *Br J Haematol* 1986;52:7-12.
- 60.-Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosis of cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med*. 1994;96:239-246.

- 61.- Rasmussen K, Vyberg B, Pedersen KO, Brøchner-Mortensen J. Methylmalonic acid in renal insufficiency: evidence of accumulation and implications for diagnosis of cobalamin deficiency. *Clin Chem* 1990;36:1523-1524.
- 62.- Hvas AM, Juul S, Gerdes LU, Nexø E. The marker of cobalamin deficiency, plasma methylmalonic acid, correlates to plasma creatinine. *J Intern Med* 2000;247:507-12.
- 63.-Schneede J, Ueland PM. Application of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for routine determination of methylmalonic acid in human serum. *Anal Chem* 1995;67:812-819.
- 64.-Scheneede J, Ueland PM. Automated assay for methylmalonic acid in serum and urine by derivatization with 1-pyrenyldiazomethane, liquid chromatography and fluorescence detection. *Clin Chem* 1993;39:392-399.
- 65.-Schneede J, Ueland PM. The formation in an aqueous matrix, properties and chromatographic behavior of 1-pyrenyldiazomethane derivatives of methylmalonic acid and other short chain dicarboxylic acids. *Anal Chem* 1992;64:315-319.
- 66.-Nexø E, Hansen M, Rasmussen K, Lindgren A, Grasbeck R. How to diagnose cobalamin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest* 1994;54(Suppl 219):61-76.
- 67.-Hølleland G, Schneede J, Ueland PK, Lund PK, Refsum H, Sandberg S. Cobalamin Deficiency in General Practice. Assessment of the Diagnostic Utility and Cost-Benefit Analysis of Methylmalonic Acid Determination in Relation to Current Diagnostic Strategies *Clin Chem* 1999;45:189-98.
- 68.-Carmel R, James SJ. Alcohol abuse: an important cause of severe hyperhomocysteinemia. *Nutr Rev.* 2002;60:215–221.
- 69.-Ganji V, Kafai MR. Demographic, health, lifestyle, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:826–833.
- 70.-Martinez-Berriotxo A, Ruiz-Irastorza G, Egurbide Arberas MV, Rueda Gutierrez M, Aguirre Erraste C. Plasma homocysteine levels in systemic lupus erythematosus. *Med Clin* 2003;120(18):681-5.

- 71.-Rasmussen K, Moller J. Methodologies of testing. In: Carmel R, Jacobsen DW, eds. Homocysteine in health and disease. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2001:199–211.
- 72.-Joosten E, Lesattrer,R Reizler R. Are different reference intervals for methylmalonic acid and total homocysteine necessary in elderly people? *Eur J Haematol* 1996;57:222-226.
- 73.-Stabler SP, Allen RH, Savage DG, et al. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. *Blood* 1990;76:871-881.
- 74.-Green R. Metabolite assays in cobalamin and folate deficiency. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8:533-566.
- 75.-Joosten E, van der Berg A, Reizler R. Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B-12 (cobalamin), folate, and vitamin B-6 occur commonly in elderly people. *Am J Clin Nutr* 1993;58:468-476.
- 76.-Brattson LE, Hulberg BL, Hardebo JE. Folic acid responsive postmenopausal homocysteinemia. *Metabolism* 1985;34:1073-1077.
- 77.-Rasmussen K, Moller J, Ostergaard K, ET al. Methylmalonic acid concentrations in serum of normal subject: biologic variability and effect of oral L-isoleucine loads before and after intramuscular administration of cobalamin. *Clin Chem* 1990;36:1295-1299.
- 78.-Rasmussen K, Moller J, Lyngbak M. Within-person variation of plasma Homocysteine and effects of posture and tourniquet application. *Clin Chem* 1999;45:1850-55.
- 79.-Thirup P, Ekelund S. Day-to-day, orthostatic variation of plasma homocysteine [Abstract]. *Scand J Clin Lab Investig* 1998;58:94-95.
- 80.-Stranger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M. DACH-LIGA Homocystein (German, Austrian and Swiss Homocysteine Society): Consensus Paper on the Rational Clinical Use of Homocysteine, Folic Acid and B-Vitamins in Cardiovascular and Thrombotic Diseases: Guidelines and Recommendations. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1392-1403.
- 81.-Vester B, Rasmussen K. High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991;29:549-554.

- 82.-Andersson A, Isaksson A, Hultberg B. Homocysteine export from erythrocytes and its implication for plasma sampling. *Clin Chem* 1992;38:1311-1315.
- 83.-Allen RH, Stabler SP, Savage DG, et al. Diagnosis of cobalamin deficiency. I: usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990;34:90-9
- 84.-Møller J, Rasmussen K. Homocysteine in plasma: stabilization of blood samples with fluoride. *Clin Chem* 1995;41:758-759.
- 85.-Willems HP, Bos GM, Gerrits WB, den Heijer M, Vloet S, Blom HJ. Acidic citrate stabilizes blood samples for assay of total homocysteine. *Clin Chem* 1998;44:342-345.
- 86.-Refsum H, Smith AD. Low vitamin B-12 status in confirmed Alzheimer's disease as revealed by serum holotranscobalamin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74(7):959-61.
- 87.-Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Geisel J. Functional vitamin B12 deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1478-88.
- 88.-Van Asselt, Thomas CM, Segers MF, Blom HJ, Wevers RA, Hoefnagels WH. Cobalamin-binding proteins in normal-deficient older subjects. *Ann Clin Biochem* 2003;40:65-9.
- 89.-Wickramasinghe SN, Ratnayaka ID. Limited value of serum holotranscobalamin II measurements in the differential diagnosis of macrocytosis. *Clin Pathol* 1996;49:755-8.
- 90.-Ulleland M, Eilertsen I, Quadros EV, et al. Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. *Clin Chem*. 2002;48:526-532.
- 91.-Wright ZL, Hvas AM, Moller J, Sanders TAB, Nexø E. Holotranscobalamin as an indicator of dietary vitamin B₁₂ deficiency. *Clin Chem* 2003;49:2076-8.
- 92.-Carmel R. Measuring and interpreting holo-transcobalamin (holotranscobalamin II). *Clin Chem*. 2002;48:407-409.

- 93.-Teplitzky V, Huniner D, Zoldan J, Pitlik S, Shohat M, Mittelman M. Hereditary partial Transcobalamin II deficiency with neurologic, mental and hematologic abnormalities in children and adults. *Isr Med assoc J* 2003;5:868-72.
- 94.-Toh BH, van Driel IR, Gleeson PA. Mechanisms of disease: pernicious anemia (review). *N Engl J Med* 1997;337:1441-8.
- 95.-Lindgren A, Lindstedt G, Kilander AF. Advantages of serum pepsinogen A combined with gastrin or pepsinogen C as first line analytes in the evaluation of suspected cobalamin deficiency: a study in patients previously not subjected to gastrointestinal surgery. *J Intern Med* 1998;244:341-9.
- 96.-Carmel R. Pepsinogens and other serum markers in pernicious anemia. *Am J Clin Pathol* 1988;90:442-445.
- 97.-Scarlett JD, Read H, O'Dea K, et al. Protein-bound cobalamin absorption declines in the elderly. *Am J Hematol* 1992;39:79-83.
- 98.-Kekki M, Samloff IM, Varis K, et al. Serum pepsinogen I and serum gastrin in the screening of severe atrophic corpus gastritis. *Scand J Gastroenterol suppl* 1991;186:109.
- 99.-DeAizpurua HJ, Cosgrove LJ, Ungar B, et al. Autoantibodies cytotoxic to gastric parietal cells in serum of patients with pernicious anemia. *N Eng J Med* 1983;309:625-629.
- 100.-TeVelde K, Abels J, Anders GJPA, et al. A family study of pernicious anemia by an immunologic method. *J Lab Clin Med* 1964;64:177-187.
- 101.-Strickland RG, Hooper B. The parietal cell heteroantibody in human sera: prevalence in a normal population and relationship to parietal cell autoantibody. *Pathology* 1972;4:259-263.
- 102.-Fairbanks VF, Lennon VA, Kokmen E, et al. Tests to pernicious anemia: serum intrinsic factor blocking antibody. *Mayo Clin Proc* 1983;58:203-204.
- 103.-Lee GR. Megaloblastic and nonmegaloblastic macrocytic anemias. In: Lee GR. Ed *Clinical Hematology*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger 1993;745-790.

- 104.-Rose MS, Chanarin I, Doniach D, et al. Intrinsic factor antibodies in absence of pernicious anemia: 3-7 year follow-up. *Lancet* 1970;2:9-12.
- 105.-Nexo E, Hansen M, Rasmussen K, Lindgren A, Gasbeck R. How to diagnose cobalamin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1994;219:61-76.
- 106.-Carmel R, Rasmussen K, Jacobssen DW, Green R. Comparison of the deoxyuridine suppression test with serum levels of methylmalonic acid and homocysteine in mild cobalamin deficiency. *Br J Haematol* 1996;93:311-8.
- 107.-Stabler SP, Lindenbaum DG, Savage DG, Allen RH. Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. *Bood* 1993;81(12):3404-413.
- 108.-Patel A, Chanarin I. Restoration of normal red cell size after treatment in megaloblastic anemia. *Br J Haematol* 1975;30:57-63.
- 109.-Alstrom T, Gasbeck R, Lindblad B, Solberg HE, Winkel P, Viinikka L. Establishing reference values from adults: recommendation on procedures for the preparation of individuals, collection of blood, and handling and storage of specimens. Committee on Reference Values of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry. *Scand J Clin Lab Invest* 1993;53:649-652.
- 110.-Fairbank VF. Test for pernicious anemia: The "Schilling test". *Mayo Clin Proc* 1983;58:541-544.151.-
- 111.-Carmel R, Green R, Rosenblatt DS and Watkins D. Update on Cobalamin, Folate, and Homocysteine. *American Society of Hematology*
- 112.-Savage DG, Lindenbaum J. Folate-cobalamin interactions in: Bailey. Ed. *Folate in Health and disease*. New York, NY:Marcel Dekker Inc;1995:237-285.
- 113.Yu MK, Rodgers GM. Detection of occult cobalamin deficiency by magnetic resonance imaging. *Am J Hematol* 2000;65:83-4.
- 114.-Morita S, Miwa H, Kihira T, Kondo T. Cerebellar ataxia and leukoencephalopathy associated with cobalamin deficiency. *J Neurol Sci* 2003;216:183-4.

- 115.-Burkes RL, Cohen H, Krailo M, Sinow RM, Carmel R. Low serum cobalamin levels occur frequently in the acquired immune deficiency syndrome and related disorders. *Eur J Haematol.* 1987;38:141–147.
- 116.-Liaugaudas G, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH, Bostom AG. Renal insufficiency, vitamin B(12) status, and population attributable risk for mild hyperhomocysteinemia among coronary artery disease patients in the era of folic acid-fortified cereal grain flour. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:849–851.
- 117.-Baum MK, Shor-Posner G, Lu Y et al. Micronutrients and HIV-1 disease progression. *AIDS* 1995;9:1051-6.
- 118.-Lindenbaum J. Aspects of vitamin B₁₂ and folate metabolism in malabsorption syndromes. *Am J Med.* 1979;67:1037–1048.
- 119.-Carmel R, Aurangzeb I, Qian D. Associations of food-cobalamin malabsorption with ethnic origin, age, *Helicobacter Pylori* infection, and serum markers of gastritis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:63-70.
- 120.-Refsum H, Yajnik CS, Gadkari M, et al. Hyperhomocysteinemia and elevated methylmalonic acid indicate a high prevalence of cobalamin deficiency in Asian Indians. *Am J Clin Nutr.* 2001;74:233–241.
- 121.-Carmel R, Mallidi PV, Vinarskiy S, Brar S, Frouhar Z. Hyperhomocysteinemia and cobalamin deficiency in young Asian Indians in the United States. *Am J Hematol.* 2002;70:107–114.
- 122.-van Asselt DZ, van den Broek WJ, Lamers CB, Corstens FH, Hoefnagels WH. Free and protein-bound cobalamin absorption in healthy middle-aged and older subjects. *J Am Geriatr Soc* 1966;44:949-953.
- 123.- Johnson MA Hawthorne NA, Brakett WR, Fischer JG, Gunter EW, Allen RH and Stabler SP. Hyperhomocysteinemia and vitamin B-12 deficiency in elderly using Title IIIc nutrition services. *Am J Clin Nutr* 2003;77:211-20.
- 124.-Lawrence JM, Petitti DB, Watkins M, Umekubo MA. Trends in serum folate after food fortification. *Lancet* 1999;354:915–6.
- 125.-Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999;340:1449–54.

- 126.-Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995;274:1049-57.
- 127.-Herbert V, Bigaouette J. Call for endorsement of a petition to the Food and Drug Administration to always add vitamin B-12 to any folate fortification. *Am J Clin Nutr* 1997;65:572-3.
- 128.-Mills JL, Von Koborn J, Conley MR, Zeller JA, Cox C, Williamson RE, Dufour DR. Low vitamin B-12 concentrations y patients without anemia: the effect of folic acid fortification of grain. *Am J Clin Nutr* 2003;77(6):1474-7.
- 129.- Linnell JC, Smith AD, Smith CL, Wilson J, Matthews DM. Effects of smoking on metabolism and excretion of vitamin B₁₂. *Br Med J* 1968;2:215-216.
- 130.-Fernandes-Costa F, van Tonder S, Metz J. A sex difference in serum cobalamin and transcobalamin levels. *Am J Clin Nutr* 1985;41:784-786.
- 131.-Low-Beer TS, McCarthy CF, Austad WI, Brzechwa-Ajdukiewicz A, Read AE. Serum vitamin B₁₂ levels and vitamin B₁₂ binding capacity in pregnant and non pregnant Europeans and West Indians. *Br Med J* 1968;4:160-161.
- 132.-Metz J, Hard D, Harpending HC. Iron, folate, and vitamin B₁₂ nutrition in a hunter-gatherer people: A study of the Kung Bushmen. *Am J Clin Nutr* 1971;24:229-242.
- 133.-Rosner F, Schreiber ZA. Serum vitamin B₁₂ and vitamin B₁₂ binding capacity in chronic myelogenous leukemia and other disorders. *Am J Med Sci* 1972;263:473-480.
- 134.-Scott JM, Bloomfield FJ, Stebbins R, Herbert V. Studies on derivation of transcobalamin 3 from granulocytes. Enhancement by lithium and elimination by fluoride of in vitro increments in vitamin B₁₂ binding capacity. *J Clin Invest* 1974;53:228-239.
- 135.-Herbert V, Jacob E, Wong KT, Scott J, Pfeiffer RD. Low serum vitamin B₁₂ levels in patients receiving ascorbic acid in megadoses: Studies concerning the effect of ascorbate on radioisotope vitamin B₁₂ assay. *Am J Clin Nutr* 1978;31:253-258.

- 136.-Doi K, Matsuura M, Kawara A, Tanaka T, Baba S. Influence of dietary fiber(Konjac Mannan) on absorption of vitamin B₁₂ and vitamin E. *Tohoku J Exp Med* 1983;141:677-681.
- 137.-Sebekova K, Krajcovicová-Kudlácková M, Blazíček P, Parrák V, Schinzel R, Heidland A. Functional hyperhomocysteinemia in healthy vegetarians: No association with advanced glycation end products, markers of protein oxidation, or lipid peroxidation after correction with vitamin B₁₂. *Clin Chem* 2003;49:963-6.
- 138.-Herbert V. Vitamin B₁₂, plant sources, requirements and assay. *Am J Clin Nutr* 1998;48:852-8.
- 139.-Davis RE. Clinical chemistry of vitamin B₁₂. *Adv Clin Chem* 1985;24:163-216.
- 140.-Miller DR, Specker BL, Ho ML, Norman EJ. Vitamin B-12 status in a macobiotic community. *Am J Clin Nutr* 1991;53:524-29.
- 141.-Alexander D, Ball MJ, Mann J. Nutrient intake and haematological status of vegetarians and age-sex matched omnivores. *Eur J Clin Nutr* 1994;48:538-46.
- 142.-Rauma AL, Törrönen R, Hänninen O, Mykkänen H. Vitamin B-12 status of long.term adherents of stric uncooked vegan diet ("living food diet") is compromised. *J Nutr* 1995;125:2511-5.
- 143.-Bevan DH, Butler T. Cyanocobalamin (vitamin B-12) status in Seventh-day Adventist ministers in Australia. *Am J Clin Nutr* 1999;70(S):576S-578S.
- 144.-Higginbottom MC, Sweetman L, Nyhan WL. A syndrome of methylmalonic aciduria, homocystinuria, megaloblastic anemia and neurological abnormalities in a vitamin B₁₂ deficient breastfed infant of strict vegetarian. *N Engl J Med* 1978;299:317-323.
- 145.-Sklar R. Nutritional vitamin B₁₂ deficiency in a breast-fed infant of a vegan-diet mother. *Clin Pediatr* 1986;25:219-221.
- 146.-Specker BL, Miller D, Norman EJ, Greene H, Hayes KC. Increased urinary methylmalonic acid excretion in brease-fed infants of vegetarian mothers and an identification of an acceptable source of vitamin B₁₂. *Am J Clin Nutr* 1988;47:89-92.

- 147.-Dagnelie PC, van Staveren WA, Vergote FJVRA, Dingjan PG, van der Berg H, Hautvast JGAJ. Increased risk of vitamin B-12 and iron deficiency in infants on macrobiotic diets. *Am J Clin Nutr* 1989;50:818-824.
- 148.-Kuhne T, Bubl R, Baumgartner R. Maternal vegan diet causing a serious infantile neurological disorder due to vitamin-B12 deficiency. *Eur J Pediatr* 1991;150:205-208.
- 149.-Carmel R, Sinow RM, Karnaze DS. Atypical cobalamin deficiency subtle biochemical evidence of deficiency is commonly demonstrated in patients without megaloblastic anemia and is often associated with protein-bound cobalamin malabsorption. *J Lab Clin Med* 1987;109:454-463.
- 150.-Thorogood M, Roe L, McPherson K, Mann JI. Dietary intake and plasma lipid levels: lessons from a study on the diet of health conscious groups. *BMJ* 1990;300:1271-1301.
- 151.-Margetts BM, Armstrong BK, Bekin LJ, Vamdongen R. Vegetarian diet in mild hypertension: a randomised controlled trial. *BMJ* 1986;293:1468-71.
- 152.-Thorogood M, Carter R, Benfield L, McPherson K, Mann JI. Plasma lipids and lipoprotein cholesterol concentration in people with different diets in Britain. *BMJ* 1987;295:351-3.
- 153.-Hostmark AT, Lystad E, Vellar OD, Hovi K, Berg JE. Reduced plasma fibrinogen, serum peroxides, lipids and apolipoprotein after a three week vegetarian diet. *Plant Food Hum Nutr* 1993;43:55-61.
- 154.- M. Dietary determinants of ischaemic heart disease in health conscious Mann JI, Appleby PN, Key TJ, Thorogood individuals. *Heart* 1997;78:450-5.
- 155.-Fraser GE, Shavlik DJ. Risk factors for all cause and coronary heart disease mortality in the older-old. The Adventist Health Study. *Arch Int Med* 1997;157:2249-58.
- 156.-Key TJA, Thorogood M, Appleby PN, Burr ML. Dietary habits and mortality in 11.000 vegetarians and health conscious people: results of a 17 year follow up. *BMJ* 1996;313:775-9.
- 157.-Herbert V. Staging vitamin B-12 (cobalamin) status in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 1994;59(5):1213S-1222S.

- 158.-Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999;131:363-75.
- 159.-Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation Products as a new marker of oxidative stress in uremia. *Kidney int* 1996;49:1304-13.
- 160.-Münch G, Keis R, Wessels A, Riederer P, Bahner Y, Heidland A, et al. Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem* 1997;35:669-77.
- 161.-Mellinghoff AC, Reininger AJ, Wuerth JP, Founds HW, Landgraf R, Hepp KD. Formation of plasma advanced glycosylation end products (AGEs) has no influence on plasma viscosity. *Diabet Med* 1997;14:832-6.
- 162.-Schneede J, Dagnaelie PC, van Staveren WA, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM. Methylmalonic acid and homocysteine in plasma as indicators of functional cobalamin deficiency in infants on macrobiotic diets. *Pediat Res* 1994;36:194-201.
- 163.-Mezzano D, Muñoz X, Martinez C, Cuevas A, Panes O, Aranda E, Guasch V, Strobel P, Muñoz B, Rodriguez S, Pereira J, Leighton F. Vegetarians and cardiovascular risk factors: hemostasis, inflammatory markers and plasma homocysteine. *Thromb Haemostas* 1999;81:913-7.
- 164.-Kromhout D, Bosschieter EB, De Lezenne, Coulander C. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* 1985;312:1205-9.
- 165.-Shekelle R, Missell L, Paul O, MacMillan-Schryock A, Stamler J. Fish consumption and mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* 1985;313:820.
- 166.-Dyerberg J, Bang HO. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet* 1979;2:433-5.
- 167.-Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999;70(S):560S-569S.

- 168.-Mezzano D, Kosiel K, Martinez C, Cuevas A, Panes O, Aranda E, Strobel P, Pérez DD, Pereira J, Rozowki J, Leighton F. Cardiovascular Risk Factors in vegetarians: Normalization of Hiperhomocysteinemia with Vitamin B12 and Reduction of Platelet Aggregation with n-3 Fatty Acids. *Thrombosis Research* 2000.
- 169.-Verhaeverbeke I, Mets T, Mulkens K, Vandewonde M. Normalization of low vitamin B12 serum levels by oral treatment. *Journal of the American geriatrics society* 1997;45:124-5.
- 170.-Elia M. Oral or parenteral therapy for B12 deficiency. *Lancet* 1998;352:1721-22.
- 171.-Ross GIM, Mollin DL, Cox EV, Ungley CC. Hematologic responses and concentration of vitamin B12 in serum and urine following oral administration of vitamin B12 without intrinsic factor. *Blood* 1954;9:473.
- 172.-Heinrich HC, Gabbe EE. Experimental basis of oral and parenteral therapy with cyano-and aquacobalamin, in Linnell JC, Bhatt HR (eds) *Biomedicine and Physiology of vitamin B12*. London. UK. The Children's Medical Charity. 1990.p51.
- 173.-Berlin H, Berlin R, Brante G. Oral treatment of pernicious anemia with high doses of vitamin B12 without intrinsic factor. *Acta Med Scand* 1968;184:247.
- 174.-Waife SO, Jansen CJ, Crabtree RE, Grinnan EL, Fouts PJ. Oral vitamin B12 without intrinsic factor in the treatment of pernicious anemia. *Ann Intern Med* 1963;58:810.
- 175.-McIntyre PA, Hahn R, Masters JM, Krevans JR. Treatment of pernicious anemia with orally administered cyanocobalamin (vitamin B12). *Arch Intern Med* 1960;106:280.
- 176.-Unglaub WG, Goldsmith GA. Oral vitamin B12 in the treatment of macrocytic anemias. *Southern Med J* 1955;48:261.
- 177.-Magnus EM. Cobalamin and unsaturated transcobalamin values in pernicious anaemia: Relation to treatment. *Scand J Haematol* 1986;36:457.
- 178.-Kuzminski AM, Del Giacco EJ, Allen RH, Stabler SP, Lindembaum J. Effective treatment of cobalamin deficiency with oral cobalamin. *Blood* 1998;92:1191-1198.

- 179.-Takasaki Y, Moriuchi Y, Tsushima H, Ikeda E, Koura S, Taguchi J, Fukushima T, Tomonaga M, Ikeda S. *Rinsho Ketsueki* 2002;43(3)165-9.
- 180.-Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PWF, Stabler SP, Allen RH. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *Am J Clin Nutr* 1994;60:2.
- 181.-Hathcock JN, Troendle GJ. Oral cobalamin for treatment of pernicious anemia ? *J Am Med Assoc* 1991;265:96.
- 182.-Middleton J, Wells W. Vitamin B12 injections: Considerable source of work for the district nurse. *Br Med J* 1985;290:1254.
- 183.-Hoffman CF, Palmer DM, Papadopolulos D. Vitamin B12 deficiency: a case report of ongoing cutaneous hyperpigmentation. *Cutis* 2003;71:127-30.
- 184.-Savage D, Lindenbaum J. Relapses after interruption of cyanocobalamin therapy in patients with pernicious anemia. *Am J Med* 1983;74:765.
- 185.-Sharabi A, Cohen E, Sulkes J, Garty M. Replacement therapy for vitamin B12 deficiency: comparison between the sublingual and oral route. *Br J Clin Pharmacol* 2003;56:635-8.
- 186.- Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline/ a report of the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline and Subcommittee on Upper Levels on Nutrients, Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. Washington, DC: National Academy Press. 1998.
- 187.-Rampersaud GC, Kauwell GP, Bailey LB. Folate: a key to optimizing health and reducing disease risk in the elderly. *J Am Coll Nutr* 2003;22(1):1-8.
- 188.-Food and Nutrition Board—Institute of Medicine. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, DC: National Academy Press; 1998.

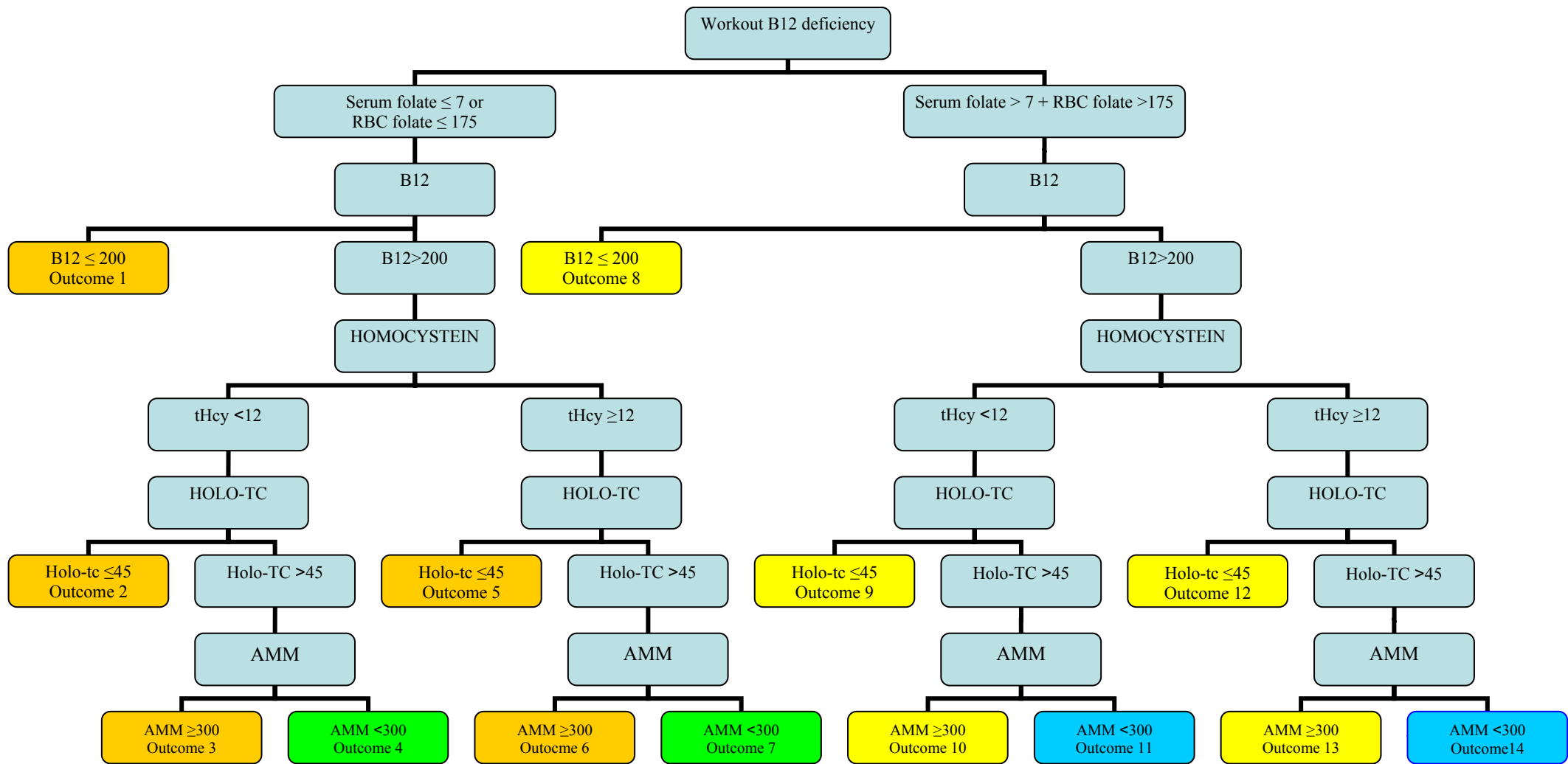


Figura 2. En amarillo deficiencia de B₁₂

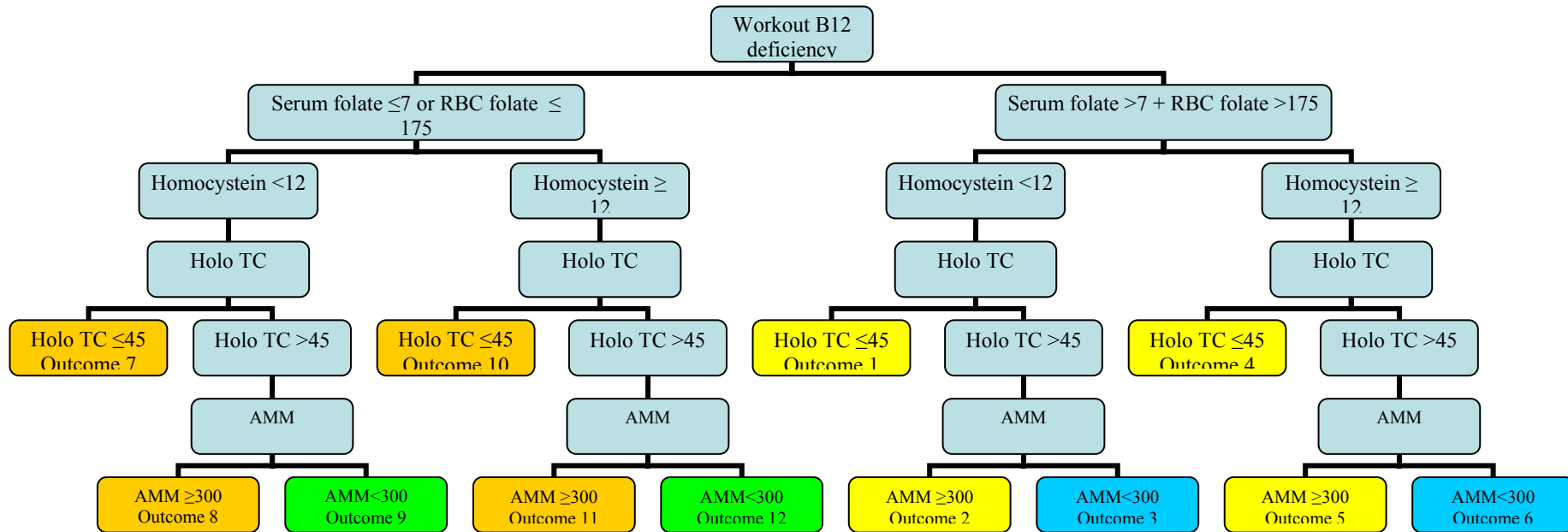


Figura 3. En amarillo deficiencia de B₁₂

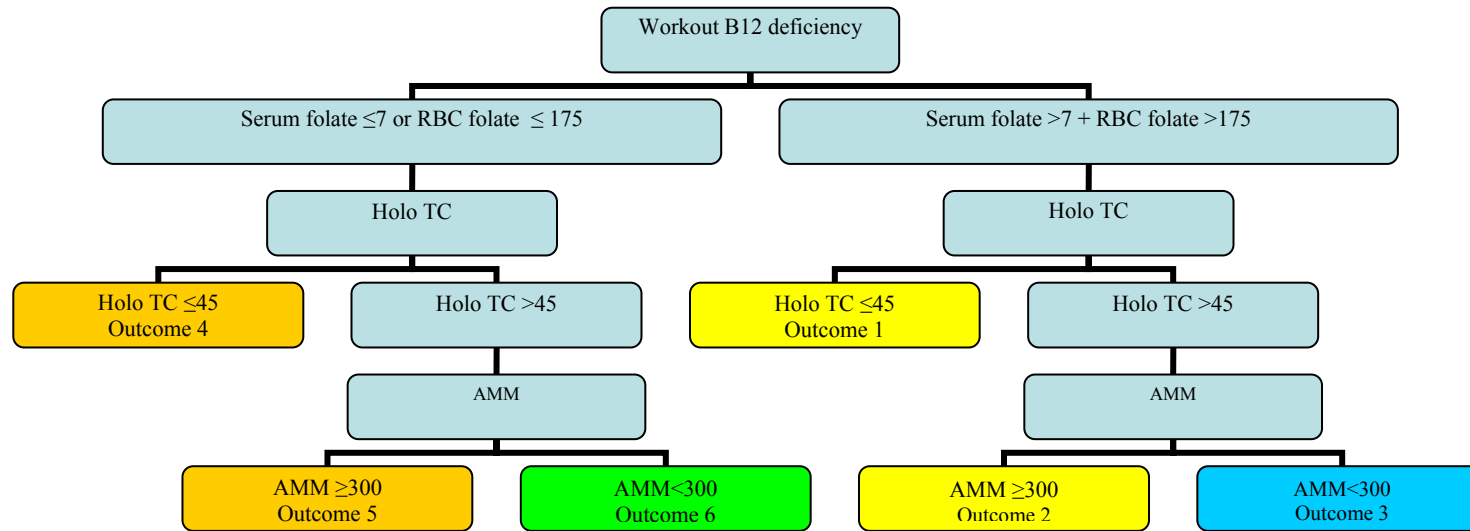


Figura 4. En amarillo deficiencia de B₁₂

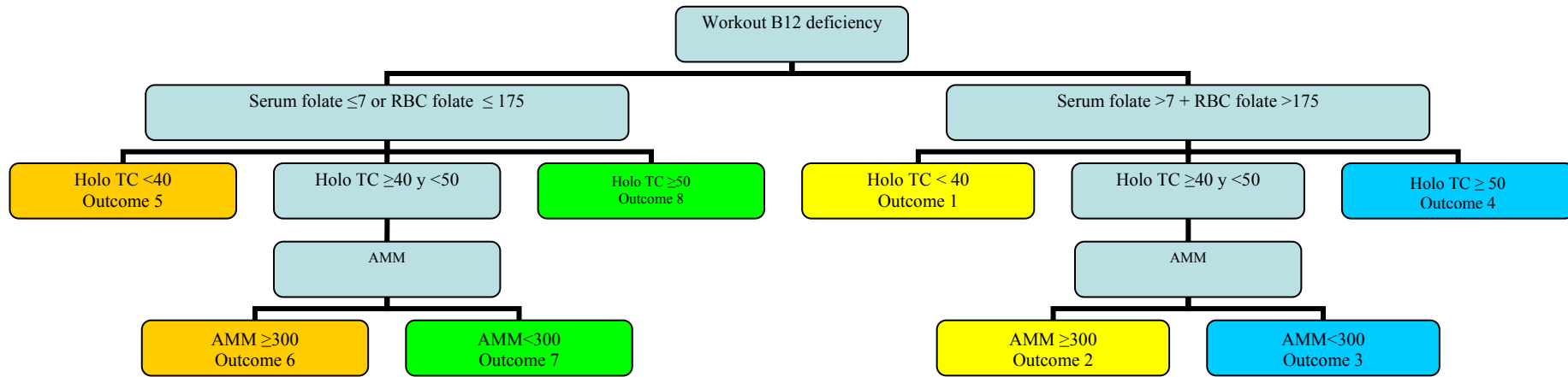
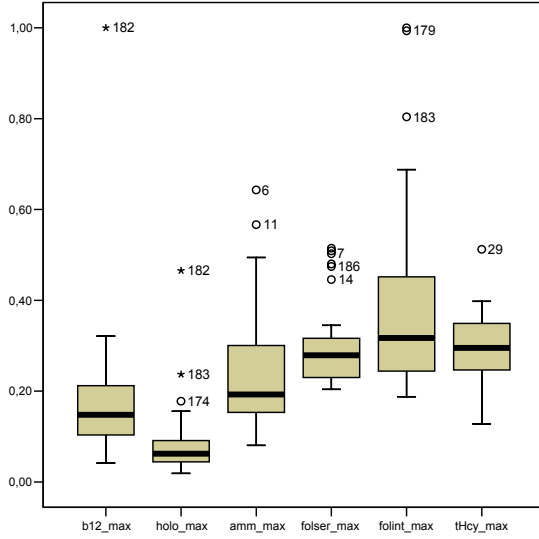
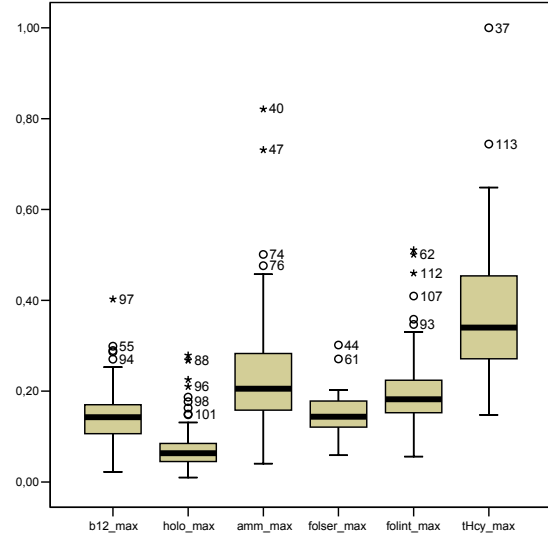


Figure 5. Standardized variables in Diagnostic Scheme 3

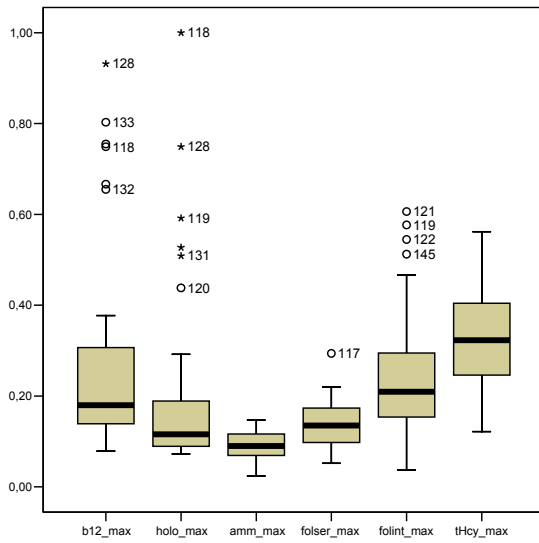
a) Vitamin B12 deficiency



b) Combined Deficiency



c) Isolated Folate deficiency



d) Normal

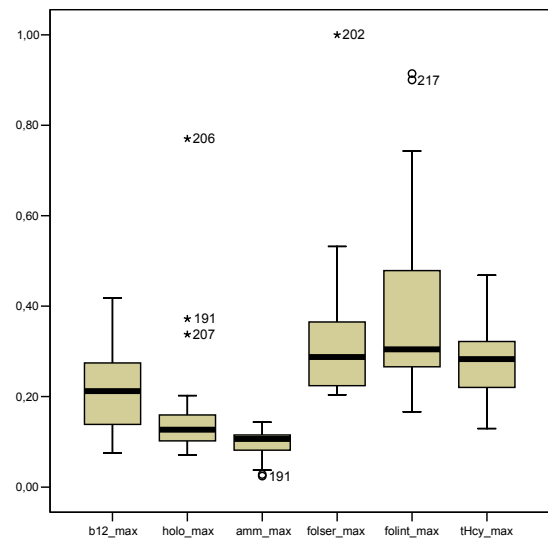
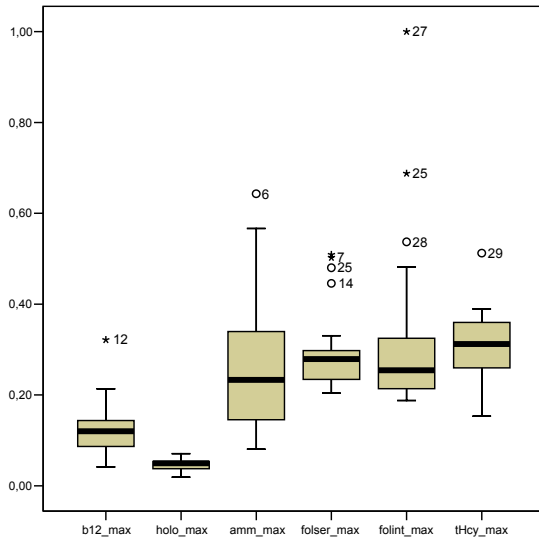
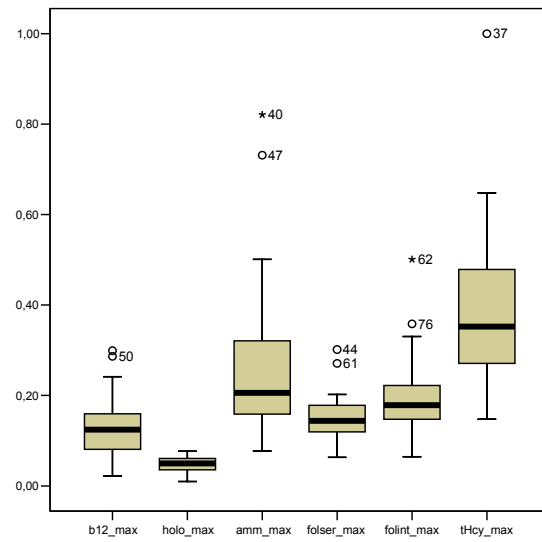


Figure 6. Standardized variables in Diagnostic Scheme 4

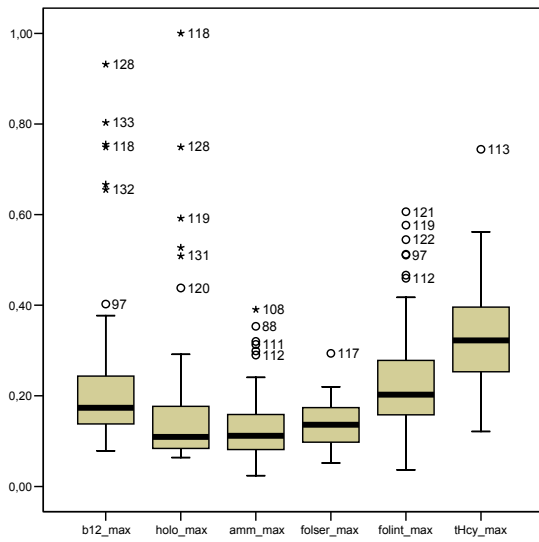
a) Vitamin B12 deficiency



b) Combined. Deficiency



c) Folate deficiency



d) Normal

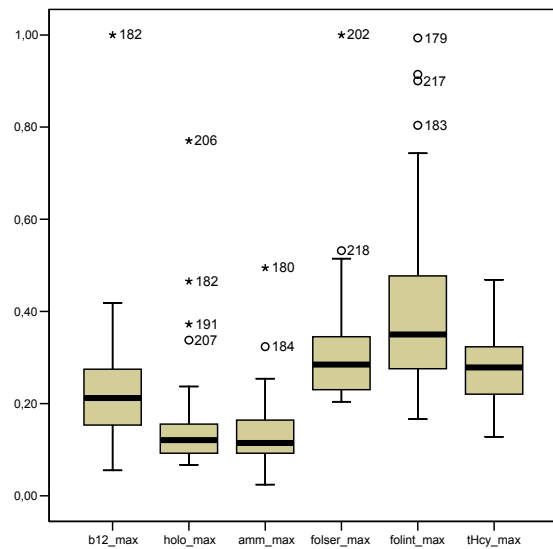


Figure 7. Mean value of the index in the 4 outcome groups of Diagnostic Scheme 3

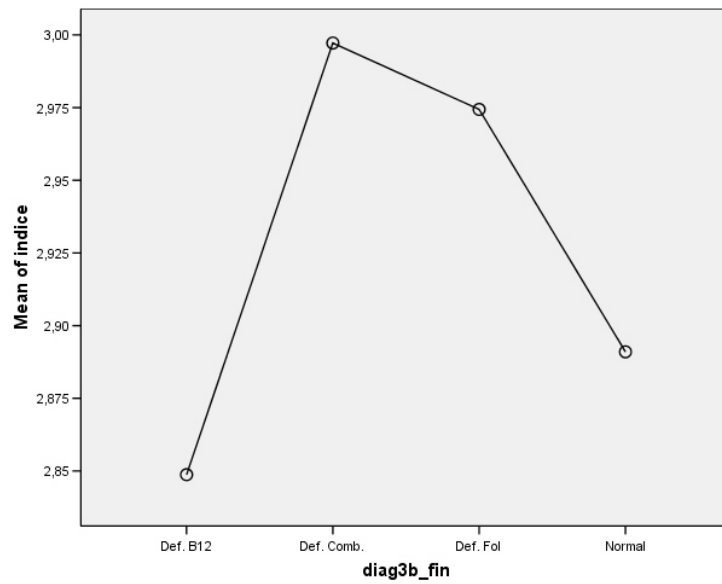
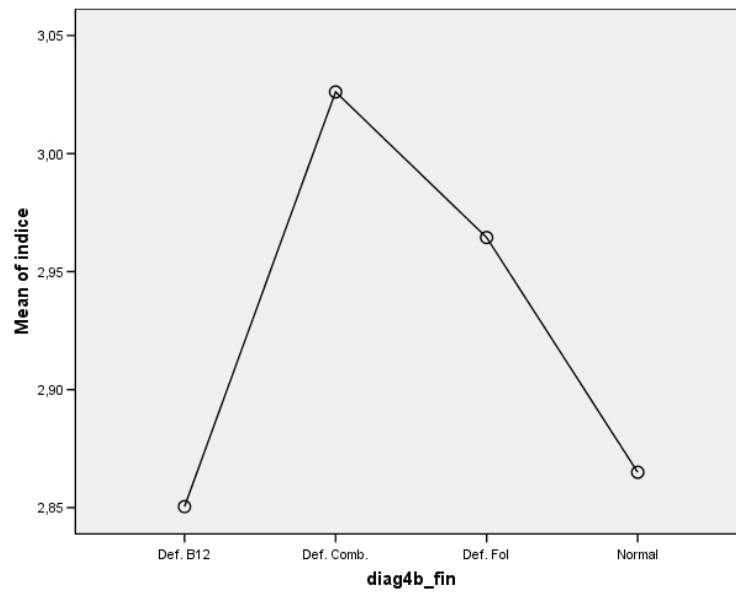


Figure 8. Mean value of the index in the 4 outcome groups of Diagnostic Scheme 4



VITAMINA B₆

VITAMIN B₆ STATUS, DEFICIENCY AND ITS CONSEQUENCES – AN OVERVIEW

Spinneker A.³, Sola R.^{1,2}, Lemmen V.^{2,3}, Gonzalez-Gross M.^{2,3,4},

Castillo MJ.², Pietrzik K.³

¹Servicio de Hematología. Hospital Universitario San Cecilio. Granada.
Spain.

²Grupo Effects 262. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.
Spain.

³Institut für Ernährungs-und Lebensmittelwissenschaften, Rheinische
Friedrichs-Wilhelms Universität Bonn, Germany

⁴Facultad de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte. Universidad
Politécnica de Madrid. Spain.

Address for correspondence:

Prof. Dr. Marcela Gonzalez-Gross

Facultad de CC de la Actividad Física y del Deporte

Universidad Politécnica de Madrid

c/ Martín Fierro s/n

E-28040 Madrid

Tel.: +34 91 336 4006

Fax: +34 91 5497307

e-mail: marcela.gonzalez.gross@upm.es

Abstract:

Vitamin B₆ is thought to be a most versatile coenzyme that participates in more than 100 biochemical reactions. It is involved in amino acid and homocysteine metabolism, glucose and lipid metabolism, neurotransmitter production and DNA/RNA synthesis. Vitamin B₆ can also be a modulator of gene expression. Nowadays, clinically evident vitamin B₆ deficiency is not a common disorder, at least in the general population. Nevertheless, a subclinical, undiagnosed deficiency may be present in some subjects, particularly in the elderly.

In fact, it has been proposed that suboptimal vitamin B₆ status is associated with certain diseases that particularly afflict the elderly population: impaired cognitive function, Alzheimer's disease, cardiovascular disease, and different types of cancer. Some of these problems may be related to the elevated homocysteine concentrations associated to vitamin B₆ deficiency, but there is also evidence for other mechanisms independent of homocysteine by which a suboptimal vitamin B₆ status could increase the risk for these chronic diseases.

Key words: Vitamin B₆ - coenzyme – elderly – homocysteine – vitamin B₆ deficiency

Introduction

Vitamin B₆ sufficiency is required for optimal health. This is due to the participation in many different biochemical reactions. Vitamin B₆ and its derivatives are needed, especially in their coenzyme function, for the main metabolic pathways in the human body. For that reason, it is clear that a vitamin B₆ deficiency, even in mild forms, has effects on the human metabolism. Several diseases and impairments of health are connected to the wide variety of B₆ functions in suboptimal status. This can also be worsening through ageing.

This article gives a brief overview about vitamin B₆ in general, its functions, requirements and measurement. Further, we will discuss detailed associated diseases as possible effects of vitamin B₆ deficiency and talk about prevention potentials.

Vitamin B₆ – Chemistry, metabolism and bioavailability

Vitamin B₆ comprises a group of three related 3-hydroxy-2-methyl-pyrimidine derivatives. The derivative pyridoxine (PN) is an alcohol, pyridoxal (PL) is an aldehyde and pyridoxamine (PM) contains an amino group. Their respective 5'-phosphate esters: pyridoxine 5'-phosphate (PNP), pyridoxal 5'-phosphate (PLP) and pyridoxamin-5'-phosphate (PMP) are the biological active coenzyme forms (figure 1). They are water-soluble and can be inter-converted in normal human metabolism (Bässler 2002). PLP is the major form that is used by pyridoxine-dependent enzymes. These enzymes catalyse more than 100 essential biochemical reactions in human metabolism.

B₆ vitamers are similarly absorbed in the upper jejunum and little in ileum, but before absorption, phosphate esters must be hydrolysed by alkaline phosphatase or other intestinal phosphatases. The non-phosphorylated form enters the mucosal cells by two different processes according to luminal concentration. At low concentrations, vitamers enter the cell by an active process regulated by requirements. At high concentrations, transport is by non-saturable passive diffusion mechanisms (Bässler 2002). Once in the cell, vitamers are phosphorylated by ATP dependent pyridoxine kinase in a process referred to as *metabolic trapping*. The phosphorylated form can not traverse cell membranes and must therefore be dephosphorylated again before traversing the basolateral membrane side of the mucosal cell.

Once in the circulation, most of B₆ vitamers are transported to the liver where they are again phosphorylated to PNP, PLP or PMP, and then released to plasma (Board 1998; Bässler 2002). Vitamin B₆ in plasma is mainly PLP (60%), PN (15%) and PL (14%). These vitamers circulate bound to albumin (Bässler 2002). In peripheral tissues, in order to cross cell membranes, the phosphorylated forms need to be dephosphorylated by alkaline phosphatase. Transport into tissue cells is by gradient diffusion. This gradient is maintained thanks to the immediate rephosphorylation occurring inside the cells. Intracellular accumulation of PLP seems to be limited by intracellular protein binding capacity. In circulation, PLP may enter red blood cells where PLP binds to haemoglobin. In red cell mass, PLP is at higher concentration (4 to 5 times) than in plasma. PLP increases the oxygen affinity of haemoglobin (Ink 1982). Total body stores of B₆ have been estimated to be as little as 167 mg (Lui, Lumeng et al. 1985). Up to 80% of that amount is found in muscle tissue (Board 1998). PLP in metabolism occurs mainly in the liver where it is oxidised to 4-pyridoxic-acid (4-PA) which is released and excreted. Almost 50% of urinary vitamin B₆ is 4-PA. In total, some 2 mg vitamin B₆ can be excreted every day. In cases of B₆ deficiency, excretion appears to be lower. PN is also excreted in faeces but to a limited extent and can therefore be neglected (Lui, Lumeng et al. 1985).

Gregory has reviewed the bioavailability of vitamin B₆ (Gregory 1997). In a diet typically containing about 15% PN glucoside, which is about 50% as bioavailable as the other vitamers, vitamin B₆ is about 75% bioavailable. The bioavailability of non-glucosides of the vitamin is greater than 75%. In the absence of food B₆ compounds are absorbed similarly, even at high doses. A loading dose of 50 mg PL or PLP is found up to 70% in the urine within 24 hours. This demonstrates that the phosphate esters are effectively hydrolysed and absorbed in the gut (Snell 1958; Shane 1978); whereas only 40% PN can be accounted for in the urine under the same conditions, it does raise the plasma PLP concentration and is retained more effectively than is PL (Shane 1978). Dietary PM and PL are about 10% less effective than PN in raising the plasma PLP concentration, and slightly more of these vitamins are excreted in the urine as 4-PA (Wozenski, Leklem et al. 1980). Most controlled B₆ studies have used PN as the added source, but requirements calculated from these studies would underestimate the B₆

requirement by 5% or less for individuals deriving most of their B₆ as PLP and PMP from animal source.

Functions and vitamin B₆-dependent enzymes

Since vitamin B₆ is a coenzyme in many different metabolic reactions, we can consider that vitamin B₆ has a wide variety of functions in the human body. PLP, as coenzyme, is required for reactions in different metabolic pathways. To carry out its catalytic action, the carbonyl group present in PLP forms a Schiff's base with the ϵ -amine of lysine of the apo-enzyme and then the initial catalytic step proceeds by the formation of a Schiff's base between the α -amino group of an amino-acid and the carbonyl group of PLP (Board 1998). The electron sink properties of PN enable the holo-enzyme for its catalytic reaction (Jansonius1998). In reactions associated with amino acid metabolism, PLP binding enables the amino acid for further reactions. Some of the reactions PLP is involved in are: transamination of amino acids to keto acids (which can be then used for gluconeogenesis), formation of α -aminolevuline acid (a precursor of heme group), as coenzyme in serin-palmityl-transferase (implicated in sphingomyelin synthesis), decarboxylation of L-amino acids (to yield amines, which function as neurotransmitters, hormones or biogenic amines). In the nervous system, PN-dependent enzymes fall into two categories: transaminases and L-amino acid decarboxylases. The crucial PLP-dependent steps of the synthesis of several neurotransmitters are: the enzymatic decarboxylation of 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) to dopamine, the conversion of tryptophan to both nitric acid and serotonin, and the conversion of glutamic acid to γ -aminobutyric-acid (GABA) (Kleijnen and Knipschild 1991). Another important metabolic pathway is the metabolism of one-carbon units. One-carbon (methyl) units, usually obtained from serine, are transferred to tetrahydrofolate (THF) yielding 5,10-methylene-tetrahydrofolate (5,10-methylene-THF). This reaction is catalysed by serine-hydroxymethyltransferase (SHMT), a PLP dependent enzyme (figure 2). 5,10-methylene-THF is subsequently used as a methyl donor for the synthesis of thymidylate and purines (for nucleic acid synthesis) or methionine (for protein synthesis or biological methylations). A considerable proportion of methionine is activated by ATP to form S-adenosylmethionine (SAM), which serves primarily as a universal methyl donor in a variety of

reactions. In the brain, for example, SAM-dependent methylations are extensive and the products of these reactions include several neurotransmitters such as catecholamines and indoleamines, phospholipids and myelin (Selhub, Bagley et al. 2000).

The interaction with the homocysteine (Hcy) metabolism through methionine transformation into cysteine (by cystathionine β -synthase and cystathionine- γ -lyase) (figure 2) is of growing interest since high levels of Hcy have been related to cardiovascular disease (CVD), cognitive impairment or cancer. Hcy is a sulphur-containing amino acid which is not a constituent of proteins and, in fact, an intermediate compound in methionine metabolism. There are two pathways for Hcy disposal in the human body and both are related to methionine status and vitamin B₆.

In cases of methionine excess, or when cysteine is required, Hcy enters the transsulfuration pathway which consists of condensation of Hcy with serine to form cystathionine (catalysed by cystathionine- β -synthase). Cystathionine is then degraded to cysteine and α -ketobutyrate by cystathionine γ -lyase. Both reactions require PLP as cofactor (Mudd, Skovby et al. 1985). In cases of methionine deficiency, Hcy enters the remethylation pathway which is a folate and B₁₂ dependent process (Selhub and Miller 1992).

As a coenzyme for glycogen phosphorylase, PLP is also involved in glucose metabolism. In this case, the 5-phosphate group of PLP acts as a proton donor or acceptor. In addition to these functions, PLP interacts with different proteins and plays many different roles including regulation of steroid hormone receptors, modulation of the affinity of haemoglobin into oxygen or inhibition of some transcription factors (Bässler 2002).

Measurement of vitamin B₆

Over the last decades several indicators of B₆ status have been developed. Indicators of vitamin B₆ status include direct measures, plasma or erythrocyte vitamin concentration, or urinary 4-PA; and functional measures, stimulation or activation of erythrocyte aspartate aminotransferase (α -EAST) and alanine aminotransferase (α -EALT) by PLP, or determination of tryptophan metabolites, such as urinary xanthurenic acid (XA). The increase in methionine metabolites (e.g.

Hcy, cystathionine) after a methionine load is also used as an indicator of B₆ status (Leklem 1994). All of these and their respective reference values are summarised in table 1 and briefly summed up below.

1. Direct measures in blood and urine.

(A) Plasma PLP, other vitamers and total vitamin B₆

The PLP concentration is a direct indicator for the activity of vitamin B₆ in the organism. Plasma PLP is used as the primary index of whole-body PL levels. Protein bound PLP in the plasma is in equilibrium with free PLP. Binding of PLP to protein protects it from hydrolyses by alkaline phosphatase. The plasma PLP concentration reflects liver PLP (Lumeng and Li 1974), and changes fairly slowly in response to changes in vitamin intake, taking about 10 days to reach a new steady state (Lui, Lumeng et al. 1985). PLP generally correlates with other indicators of B₆ status (Lumeng 1978). Leklem has suggested a plasma PLP concentration of 30 nmol/L as the lower end of normal status (Leklem 1990), whereas other investigators have proposed a cut-off of 20 nmol/L (Lui, Lumeng et al. 1985). Generally, values lower than 20 nmol/L indicate B₆ deficiency. Table 2 shows different physiological and other parameters which influence PLP plasma concentration (Bitsch 1993; Leklem 1994). Usually, men show higher levels than women, because of their higher muscle tissue mass. During gestation lower values of this vitamin have been observed, because of hem dilution due to changes in plasma volume. A release of muscle glycogen phosphorylase in prolonged fasting may mask an underlying deficiency, because most PLP in the body is usually bound to this enzyme. Plasma total vitamin B₆ and plasma PL concentration are additional direct measures that have utility. Since PL is the form that enters the cell, its measurement may be more relevant than that of PLP.

A number of methods have been developed for the assay of B₆ vitamers in plasma for clinical and nutritional purposes. These include microbiological or enzymatic methods. Currently, the quantitative determination of PLP in plasma is commonly performed with procedures that utilise tyrosine apodecarboxylase. Another extensively used method is a chromatographic determination. High-performance liquid chromatography (HPLC) procedures with appropriate detection systems are regarded as the most convenient method for the evaluation

of vitamin B₆ nutritional status since it is possible to quantify all vitamers and 4-PA in one assay.

(B) 24-hour urinary excretion of 4-PA and total vitamin B₆

4-PA is the major inactive metabolite of PN metabolism. Urinary 4-PA has been used extensively to evaluate B₆ requirements. Approximately 50% of the B₆ intake is excreted as 4-PA, but this proportion can vary somewhat. 4-PA excretion responds almost immediately to changes in dietary intake and therefore reflects recent dietary B₆ intake rather than tissue saturation status (Lui, Lumeng et al. 1985). Thus, 4-PA excretion should not be used for status assessment. Nevertheless, low urinary excretion implies a low intake. Leklem has suggested a value greater than 3 μmol/day as indicative of adequate status (Leklem 1990). Urine levels of 4-PA are lower in females than in males and will be reduced in persons with riboflavin deficiency. Further, different pharmaceuticals (isoniacid, penicillin, and cyclosporine) increase urinary excretion and interfere with the results. Neither age nor alcohol intake affects the measured level.

2. Indirect functional measures.

Activation coefficient (AC) of α-EAST and α-EALT

The stimulation of these enzymes by external (added) PLP is a frequently used functional measure of vitamin B₆ status. These indicators are considered long-term measures because of the length of the erythrocyte's lifespan (120 days). Because there is no protein synthesis in mature erythrocytes, the holo-enzyme:apo-enzyme ratio will reflect the availability of PLP at the time the erythrocytes were released into the circulation. In vitamin B₆ deficiency, a greater than normal proportion of aminotransferases is present in form of the catalytically inactive apo-enzyme. This can be converted to the catalytically active holo-enzyme by incubation *in vitro* with PLP. Since the seventies, some authors suggest that α-EALT is a more sensitive index of vitamin B₆ nutritional status than is α-EAST (Cinnamon 1970; Brown 1975; Hansen, Leklem et al. 1997). In order to overcome some of the differences in methods of measurement and in erythrocyte transaminases activities between normal healthy individuals, the results are generally expressed as an AC (ratio of activity with added

coenzyme/activity without added coenzyme). Although complete saturation of aminotransferases with PLP (AC = 1.0) does occur, some degree of unsaturation (AC > 1.0) is considered to be normal. Assuming that erythrocytes must compete with other tissues for the vitamin, and hence that erythrocyte aminotransferase saturation with PLP reflects the status of other tissues, such incomplete saturation may be a factor in normal metabolic regulation (Bender 1989). Indicator of deficiency is an AC of EAST of greater than 1.6 and of EALT of greater than 1.25 (Leklem 1990). As mentioned above, EAST-AC reduction lags behind the onset of the PN deficiency. Thus, a low aminotransferase AC value confirms a sub acute to chronic deficiency state. Chronic alcoholism causes these indices to be falsely low, and these indices decrease with age.

3. Metabolites

(A) Tryptophan load test (figure 3)

One of the earliest markers used to determine B₆ deficiency was the urinary excretion of XA, which is normally a minor tryptophan catabolite. The major pathway of tryptophan catabolism proceeds via the PLP-dependent kynureninase reaction (Shane 1980). The XA pathway also involves PLP-dependent enzymes, but kynurenine aminotransferase seems to be less sensitive to PLP deficiency. Under conditions of B₆ deficiency, this minor pathway is used to a greater extent, leading to the increased excretion of abnormal tryptophan metabolites such as XA, and as the deficiency worsens, 3-Hydroxykynurenine (3-HK) and kynurenine. The tryptophan load test has been widely used as an index of vitamin B₆ nutritional status. Various challenge doses have been used in different studies such as 2 or 3 grams, as well as 4 grams (Donald, McBean et al. 1971; Rose 1975; Leklem, Linkswiler et al. 1977; Leklem 1990; Leklem 1994). However, as for many of the tests of B₆ status, it is not clear what level of excretion represents adverse B₆ status under the conditions of the tryptophan challenge dose. A 24-hour urinary excretion of less than 65 µmol xanthurenate after a 2 g tryptophan oral dose has been suggested (Leklem 1990). The use of an oral loading dose of L-tryptophan to detect abnormalities in tryptophan and vitamin B₆ status is an underutilised laboratory procedure. If used only to measure B₆ status, it may be less indicative

than other indices, such as the methionine load test (urinary cystathionine), plasma PLP, urinary vitamin B₆, or 4-PA. It may, however, be more indicative than erythrocyte aminotransferases. Marginal B₆ or magnesium deficiencies cause significant alterations. This test is influenced by protein intake, exercise, lean body mass, and pregnancy. Hormonal factors and infections enhance tryptophan-to-niacin conversion. Thus, this test is most useful for monitoring an individual's response to PN supplementation rather than for diagnosing a deficiency.

(B) Methionine load test (figure 4)

A methionine loading test has also been studied as a possible indicator of vitamin B₆ status. Three enzymes of the methionine metabolism, cystathionine β -synthase, cystathionine γ -lyase and cysteine sulphinic acid decarboxylases, are PLP-dependent. In vitamin B₆ deficiency, a test dose of methionine (3 g in an adult) results in abnormal accumulation and excretion of Hcy and the mixed disulphide of Hcy and cysteine, as well as cystathionine and cysteine sulphinic acid, and reduced excretion of taurine (Park and Linkswiler 1970; Shin and Linkswiler 1974; Linkswiler 1981; Sturman 1981). More recently a standardised methionine load test has been successfully used (Graham, Daly et al. 1997). The general procedure involves the administration of 100 mg of L-methionine per kilogram of body weight. The increase in Hcy concentrations are evaluated in terms of the vitamin B₆ status. For several reasons, the methionine load test has been used less often as an index of vitamin B₆ nutritional status than has the tryptophan load test.

Pathophysiological implications related to vitamin B₆ deficiency

Since vitamin B₆ is present in almost all foods, B₆ deficiency due to insufficient dietary supply is rare. Additionally, isolated vitamin B₆ deficiency is uncommon and usually occurs in combination with deficiencies of other B-complex vitamins. Often PN deficiency is caused by absorption disorders, genetic factors, interactions with drugs or elevated requirements as shown in table 3. Because of its wide variety of functions in the body, clinical vitamin B₆ deficiency results in a broad spectrum of impaired features. On the other hand, borderline vitamin B₆ deficiency may represent a subtle, undiagnosed and frequent cause

of disease in some population groups. In fact, a reduced B₆ status close to borderline concentrations or even mild deficiency could persist in an individual for months or years without the appearance of any of the diagnostic features or symptoms suggesting clinical deficiency. In this situation, some PLP related functions may be adequately compensated but others may not (Rosenberg and Miller 1992). This subclinical deficiency can be attributed to inadequate intake and/or to the effect of ageing on physiological and metabolic processes, which may act in conjunction with many other factors. The most common pathophysiological implications related to vitamin B₆ deficiency are the following:

1. Hypochromic, microcytic, iron-refractory anemia

B₆-deficiency anemia is one form of sideroblastic anemia, characterised by ineffective erythropoiesis with hypochromic, microcytic anemia, splenomegaly, elevated tissue and serum iron, and large numbers of ringed sideroblasts in the bone marrow (Bottomley 1993). Microcytic anemia reflects decreased haemoglobin synthesis. Vitamin B₆ deficiency or a genetic defect of the enzyme aminolevulinate synthase can therefore lead to an iron refractory, microcytic anemia. In animals, it is well established that a deficiency of vitamin B₆ results in a severe microcytic, hypochromic anemia accompanied by strongly elevated serum iron levels (Linkswiler 1967). In humans, vitamin B₆ deficiency anemia is very rare. Therefore, literature is very scarce. In the seventies, Ofori-Nkansah *et al.* reported that the prevalence is higher in men than in women (Ofori-Nkansah, Weissenfels *et al.* 1975). Further, Fishman and colleagues suggest that a treatment with B₆ may be effective in correcting the haematological abnormalities of sideroblastic anemia (Fishman, Christian *et al.* 2000).

2. Immune function

Animal studies in the forties demonstrated that a deficiency of vitamin B₆ results in large effects on lymphoid tissues. Thymic atrophy occurs and lymphocyte depletion in lymph nodes and spleen has been found in monkeys, dogs, rats, and chickens (Stoerk 1946; Stoerk 1946). More recently, studies performed in humans confirm that vitamin affects immunocompetence (Grimble 1998). Low vitamin B₆ intake and

status have been associated with impaired immune function, especially in the elderly (Talbot, Miller et al. 1987; Meydani, Ribaya-Mercado et al. 1991). Decreased lymphocyte and interleukin (IL)-2 production has been observed in B₆-deficient individuals. Restoration of adequate vitamin B₆ status resulted in normalisation of lymphocyte proliferation and IL-2 production. These results suggest that adequate vitamin B₆ intake is important for optimal immune system function, at least in older individuals (Talbot, Miller et al. 1987; Meydani, Ribaya-Mercado et al. 1991).

Further, experimental deficiency in elderly humans has been shown to reduce total blood lymphocyte numbers and decrease the proliferative response of lymphocytes to mitogenic substances. It has been suggested that the mechanism for the effect of vitamin B₆ on immune function relates to the importance of PLP in the synthesis of one carbon compounds and hence DNA and RNA synthesis.

Low synthesis rates of the compound will thus impair cell replication (Grimble 1998). Further, U937 monocytes which were cultured with PN, PL or PM demonstrated that these vitamers can prevent the oxygen radical generation and lipid peroxidation caused by hydrogen peroxide (Kannan and Jain 2004). Others suggest a connection between inflammation and vitamin B₆ status (Chiang, Selhub et al. 2005; Chiang, Smith et al. 2005). They found significantly lower PLP concentrations in patients with rheumatoid arthritis than in healthy subjects. In contrast, no difference was found between patients and controls in erythrocyte PLP or erythrocyte α -EAST or 4-PA levels.

Therefore, they suggest that the lower vitamin B₆ concentration in patients with rheumatoid arthritis is tissue-specific. Additionally, the lower circulating PLP levels observed in rheumatoid arthritis could reflect a decrease in hepatic PLP pools, because plasma PLP is a good indicator of liver B₆ status during inflammation. Further, the study indicates that inflammation directly affects vitamin B₆ metabolism differently in different tissues (Chiang, Smith et al. 2005). The following study of the research group analysed the effect of B₆ supplements (50 mg PN hydrochloride/day) on B₆ and inflammation status. All markers of vitamin B₆ status improved significantly in the B₆ supplementation group. Although, the authors found no effect of vitamin B₆ supplementation on inflammatory cytokines, plasma CRP, ESR, or rheumatoid factor levels. They suggest that it is likely that

inflammation causes vitamin B₆ deficiency and/or impaired vitamin B₆ status contributes to more severe inflammation in patients with rheumatoid arthritis. But as improving vitamin B₆ status did not alleviate inflammation, it is unlikely that vitamin B₆ inadequacy directly causes or worsens the inflammatory condition (Chiang, Selhub et al. 2005).

3. Cancer

Some studies on diet and cancer have disclosed a significant inverse correlation between serum PLP (and vitamin B₆ intake) and different types of cancer. There are several potential mechanisms by which vitamin B₆ may influence carcinogenesis. First, B₆-deficiency causes a decrease in the enzyme activity of SHMT. This results in a lack of methylene groups for 5,10-methylene-THF production (Stabler 1997). Consequently, methylation of deoxyuridylate to deoxythymidylate may be impaired resulting in misincorporation of uracil instead of thymidine into DNA. As a consequence, a greater potential of chromosome strand breaks (Blount, Mack et al. 1997) and/or an impaired DNA excision repair may exist (Choi, Kim et al. 1998). Evidence of this has been reported (Huang, Chen et al. 1998). In addition, disruption of the above mentioned reactions may lead to imbalances in the methyl groups required for methylation processes, resulting in DNA hypomethylation. Altered DNA methylation has been observed in different types of tumors (Jones and Buckley 1990; Jarrard, Bova et al. 1996). The B₆ connection to the immune system could be a mechanism by which low vitamin B₆ status or intake also contributes to development of cancer. The two different PLP-dependent enzymes which are implicated in the transsulfuration pathway also generate cysteine, an important component of glutathione. Glutathione S-transferases and glutathione peroxidases are detoxifying agents of several carcinogenic compounds (Eto 1985; Guilarte 1993). PLP is also involved in steroid hormone action; consequently, PLP can be implicated in some types of steroid related cancer.

Some experimental studies suggest that borderline-deficient B₆ status increases sensitivity to steroid hormones, and this may have implications for breast, prostate, and uterine carcinogenesis (Bender 1988). Furthermore, one study found a steroid independent inhibition of *in vitro* breast cancer cell growth induced by PL and this was present

in oestrogen-dependent and oestrogen-independent mammary carcinoma cell lines (Davis and Cowing 2000). Many studies have shown a relation to special types of cancer. Thus, a more detailed overview may be helpful.

3.1. Colorectal cancer

Komatsu and coworkers demonstrated that vitamin B₆ intake decreased both the incidence and the number of colon tumors in an animal model; it decreased colon cell proliferation and expressions of c-myc and c-fos proteins in a dose-dependent manner (Komatsu, Watanabe et al. 2001). More recently, they also showed that the preventive effect of vitamin B₆ against colon tumorigenesis in mice is mediated by a reduction of oxidative stress and nitric oxide production (Komatsu, Watanabe et al. 2002). In humans, Wei *et al.* found out that in women plasma concentrations of PLP is inversely associated with risk for colorectal cancer (RR = 0.54 for those in the highest vs lowest quartiles, 95% CI = 0.31 to 0.92) (2005; Wei, Giovannucci et al. 2005). Other researchers found an inverse association of vitamin B₆ intake and colon cancer (Slattery, Curtin et al. 2000). Nevertheless, epidemiologic evidence is still scarce.

3.2. Pancreatic cancer

In a large nested case-control study (included in the ATBC Cancer Prevention Study cohort) a statistically significant inverse dose-response relationship was found between plasma PLP levels and pancreatic cancer risk: the risk of subjects in the highest PLP tertile was half the risk of the subjects in the lowest tertile (OR = 0.48). Interestingly, as much as fifty percent of the study population presented lower than adequate PLP plasma levels (< 30 nmol/L) (Stolzenberg-Solomon, Albanes et al. 1999). This is the first study that observed an inverse association between plasma PLP concentrations and pancreatic cancer risk. Deficiencies in PLP have been shown to impair pancreatic exocrine function in experimental animals. Plasma and pancreatic amylase, trypsin and chymotrypsin activities were found to be significantly decreased in B₆ deficient rats (Dubick, Gretz et al. 1995). This situation can theoretically lead to incomplete digestion of food, greater duodenal cholecystokinin release, and stimulation of pancreatic enzyme production, hypertrophy, and hyperplasia of

exocrine tissue, thereby increasing the susceptibility of the pancreas to carcinogens. In fact, chronic hypercholecystokinemia has been shown to enhance pancreatic carcinogenesis in experimental animals (Howatson and Carter 1985; Chu, Rehfeld et al. 1997). Finally, animals receiving inhibitors of cellular methylation reactions develop acute hemorrhagic pancreatitis as a consequence of autolytic destruction of the pancreas (Farber and Popper 1950; Goldberg, Chaikoff et al. 1950; Lombardi, Estes et al. 1975) and it is well known that chronic pancreatitis increases the risk of pancreatic cancer.

3.3. Gastric, oral and pharyngeal cancer

Several case-control studies have found that high B₆ intake was associated with a decreased risk of gastric adenocarcinomas (Harrison, Zhang et al. 1997; Zhang, Kurtz et al. 1997; Kaaks, Tuyns et al. 1998) and oral or pharyngeal cancer (Negri, Franceschi et al. 2000).

3.4. Lung cancer

A nested case-control study within the ATBC Cancer Prevention Study found a significantly lower risk of lung cancer among men who had higher plasma B₆ levels. Men presenting high B₆ plasma concentration had about half the risk of lung cancer compared to men with the lowest vitamin B₆ concentrations (OR = 0.51). This is the first report from a prospectively conducted study to suggest a role for vitamin B₆ in lung cancer (Hartman, Woodson et al. 2001).

3.5. Prostate and breast cancer

At present, there are no conclusive data relating vitamin B₆ levels and prostate or breast cancer (Key, Silcocks et al. 1997; Wu, Helzlsouer et al. 1999). One prospective, nested case-control study showed associations between the average intake of vitamin B₆ (highest vs lowest quintile) and the risk of breast cancer after adjusting for folate intake (Zhang, Willett et al. 2003). Thus, the authors suggest that folate and vitamin B₆ may have the potential to be chemopreventive against breast cancer.

4. Cognitive function

Early findings supporting the implication of vitamin B₆ status in neurocognitive functions are derived from:

- a) animal experiments on B₆ deficiency (Shwartzman 1949; Victor and Adams 1956; Schaeffer, Cochary et al. 1990);
- b) reported cases of neurological abnormalities associated to clinical vitamin deficiency (peripheral neuropathy, seizures) (McCormick 1988);
- c) familial studies on homozygous defects of genes encoding Hcy metabolism enzymes (such as cystathionine- β -synthase defect) which result in mental retardation, psychiatric disturbances and seizures (homocystinuria) (Carson, Dent et al. 1965; Valle, Pai et al. 1980).

4.1. Findings in the elderly

There are several studies providing evidence for the importance of vitamin B₆ and brain function in the elderly (Goodwin, Goodwin et al. 1983; Deijen, van der Beek et al. 1992; Riggs, Spiro et al. 1996). Significant correlations between vitamin B₆ status and memory were found in the Boston Normative Aging Study. Higher concentrations of serum vitamin B₆ were associated with better performance in two memory tests in men (aged 54 - 81 years) and this association was independent of plasma Hcy levels (Riggs, Spiro et al. 1996). Others found a significantly higher Wechsler memory score in the top 90% of vitamin B₆ intake (Goodwin, Goodwin et al. 1983). Furthermore, Deijen and coworkers reported that supplementation with vitamin B₆ could significantly improve memory in elderly men (Deijen, van der Beek et al. 1992).

Additionally, one researcher showed a statistically significant improvement in most of the cognitive function tests in a group of elderly people, supplemented with multivitamins (Chandra 2001). Subjects with lower blood levels of one or more nutrients showed lower responses on all cognitive-function tests, but there was no significant correlation between single nutrients and cognitive function test scores. This evidence favours the hypothesis that poor vitamin B₆ status could be, at least in part, responsible for the cognitive decline observed in some elderly persons. Further, several studies and meta-analyses have found inverse associations between objective measures of cognitive

function and plasma or serum Hcy concentrations (Bell, Edman et al. 1991; Boushey, Beresford et al. 1995; Riggs, Spiro et al. 1996; Jensen 1998; McCaddon, Davies et al. 1998; Lehmann, Gottfries et al. 1999; Miller 1999; Budge, Johnston et al. 2000; Nilsson, Gustafson et al. 2000; Morris, Jacques et al. 2001), but others not (Kalmijn, Launer et al. 1999; Ravaglia, Forti et al. 2000).

The increased risk for cerebrovascular disease could be due to a toxic effect of Hcy on vascular tissue (Ueland and Refsum 1989). Regarding dementia, the interaction between B₆ and Hcy is not clearly established. Low vitamin B₆ status has been associated with Alzheimer's disease (AD) and vascular dementia. Miller and others have recently reported that low PLP levels were strongly associated with AD, but not with cerebrovascular disease (Miller, Green et al. 2002). On the contrary, Faßbender and coworkers reported that compared with patients without cerebrovascular disease, patients with subcortical vessel encephalopathy showed significantly decreased plasma concentrations of vitamin B₆ (Fassbender, Mielke et al. 1999). In both studies, there was an association between Hcy and AD and microangiopathic vascular dementia, respectively, while there was no correlation between Hcy levels and vitamin B₆. Others found that individuals with hyperhomocysteinemia had a higher risk of developing AD compared with those who had normal Hcy levels (OR = 4.6) (Clarke, Smith et al. 1998). Another study found a strong relationship between periventricular and subcortical white matter lesions and low vitamin B₆ levels in patients with AD (Mulder, Scheltens et al. 2005).

4.2. Convulsive seizures

Since the fifties and sixties, PN deficiency is known to cause convulsive seizures in humans and experimental animals. Hence, a number of investigators reported disorders in central nervous system (CNS) activity in adults and infants (Coursin 1954; Bessey, Adam et al. 1957; Canham 1964; Canham, Baker et al. 1969; Coursin 1969). The neurological disorders in the infants manifested itself within 6 weeks up to 4 months by convulsive seizures, hyperirritability, and abnormal acuteness of the sense of hearing. Two reviews from the eighties summarised research on causative factors responsible for convulsions during vitamin B₆ deficiency (Dakshinamurti 1985; Anonymus 1988).

They propose two hypotheses explaining the onset of convulsive seizures. First, it has been shown that a particular nutritional deficiency leads to the accumulation of a potentially hazardous tryptophan metabolite, 3-HK in the CNS. Kynurenine transaminases and kynureninase catalyse are the main routes of 3-HK catabolism and require PLP. Reductions in their activities should lead to a build-up of 3-HK in the body and brain. Experimentally produced B₆ deficiency by Guilarte and Wagner caused a 200-fold increase in brain regional 3-HK levels. This increase led the authors speculate that such levels of 3-HK could be responsible for the convulsions that typically occur in infant B₆ deficiency (Guilarte and Wagner 1987). Another possible cause could be changes in the concentration of the neurotransmitter GABA, a major inhibitory transmitter in the CNS. GABA concentrations are reported to be low in the brains of vitamin B₆ deficient infant animals, and such animals are often seen to convulse (Dakshinamurti and Stephens 1969; Stephens, Havlicek et al. 1971; Wasynczuk, Kirksey et al. 1983). Furthermore, pharmacologic studies indicate that drugs diminishing GABA transmission in the CNS promote convulsions (Meldrum 1975).

4.3. EEG alterations

Abnormal EEG-tracing changes were reported in young adult men during experimentally induced vitamin B₆ deficiency in the sixties (Canham 1964; Canham, Baker et al. 1969). The young men were maintained for 21 days on purified diets that provide daily intakes of $\leq 0,06$ mg vitamin B₆ and either 30 or 100 g protein. The type of EEG abnormalities observed in the young men generally consisted of a slowing of activity with either increased or decreased wave amplitude, and minimal to marked build-up with hyperventilation, particularly in the frontal and parietal leads (Canham 1964). More recently studies show EEG abnormalities can develop in women with short-term vitamin B₆-depletion (< 2 weeks) (Kretsch, Sauberlich et al. 1995). Abnormal patterns could be reversed administering 0.5 mg vitamin B₆/day. EEG changes are probably caused by altered neurotransmitter metabolism in the brain and are thought to occur only in cases of frank B₆ deficiency. However, before ruling out the possibility of EEG abnormalities occurring at marginal levels of vitamin B₆ intake, research employing quantitative analysis of the EEG spectral data should be

conducted (Kretsch, Sauberlich et al. 1995). To our knowledge such research is still lacking.

4.4. Neuropathies

In the sixties, peripheral neuropathies have been reported in PN deficiency (Linkswiler 1967). Demyelination of peripheral nerves has been observed, which could be caused by a disturbance of sphingomyelin synthesis owing to a lack of PLP as cofactor for serine-palmitoyl-transferase. Recently, peripheral neuropathy caused by vitamin B₆ deficiency has been reported in patients on chronic peritoneal dialysis. Symptoms included paresthesia, burning and painful dystheseas, and thermal sensations (Moriwaki, Kanno et al. 2000). Interestingly, Gorson and Ropper found in diabetic patients with distal sensory polyneuropathies as most common laboratory abnormalities low levels of vitamin B₆ or B₁. They concluded that the frequency of low vitamin levels suggests that vitamin B₁ and B₆ levels should be assessed in future studies of diabetic patients with distal sensory polyneuropathies (Gorson and Ropper 2006).

5. CVD and Hcy

Suboptimal vitamin B₆ nutriture was first associated with vascular disease following development of atherosclerosis in monkeys fed a B₆ deficient diet (Rinehard 1949). Later, some researchers (Verhoef, Stampfer et al. 1996) reported that estimated dietary intake of vitamin B₆ and folate, and plasma concentrations of PLP and folate, were lower in patients who had myocardial infarction than in controls. They also reported that the frequency of myocardial infarction was negatively correlated with both folate and vitamin B₆ nutriture. Others confirmed the association of Hcy and vitamin B₆ (Stampfer, Malinow et al. 1992; Selhub, Jacques et al. 1993; Robinson, Mayer et al. 1995; Verhoef, Stampfer et al. 1996; Graham, Daly et al. 1997; Folsom, Nieto et al. 1998; Rimm, Willett et al. 1998; Jacques, Bostom et al. 2001; Saw, Yuan et al. 2001). Results of epidemiologic studies suggest that moderately elevated plasma or serum Hcy levels are prevalent in the general population and are associated with increased risk for CVD, independent of classical cardiovascular risk factors (Boushey, Beresford et al. 1995; Refsum, Ueland et al. 1998; Welch and Loscalzo 1998;

Eikelboom, Lonn et al. 1999). It is still unknown if this is due to the effect of vitamin B₆ on platelet function (Chang, Chuang et al. 1999; Chang, Chang et al. 2002; Kobzar 2002), connective tissue (Myers, Dubick et al. 1985), blood pressure (Vasdev 2002), thrombogenesis (Cattaneo, Lombardi et al. 2001) or, indirectly by causing hyperhomocysteinemia (Mudd 1995). Further, low circulating vitamin B₆ levels have been associated with elevation of the inflammation marker C-reactive protein independently of plasma Hcy (Friso, Jacques et al. 2001).

How to handle vitamin B₆ deficiency?

Although overt clinical deficiency of vitamin B₆ occurs only rarely, nutrition surveys indicate that vitamin B₆ intakes may be marginal or inadequate in segments of the population. Consequently, the presence of a subclinical deficiency may be fairly widespread. Especially in the elderly there is a high prevalence of deficient or borderline vitamin B₆ status. Herrmann and Knapp found vitamin B₆ deficiency in 23% of 65 – 75 year old and 40% in > 85 year old persons, respectively (Herrmann and Knapp 2002). According to the SENECA study, 23.3% of the European elderly are B₆ deficient (PLP < 20 nmol/L) (Haller, Lowik et al. 1991). A borderline deficient status, which might persist in an individual for a long time without developing clinical manifestations, could have pathological consequences. It may contribute to the development of certain diseases, as already stated above.

Treatment of B₆ deficiency

1.) Treatment of clinical deficiency

Treatment of vitamin B₆ deficiency implies mega doses of this vitamin via oral. Usually around 50 mg/day are administered depending on the cause of the deficiency; higher doses are given if vitamin B₆ deficiency is related to medication use. Some drugs (table 3) such as isoniazid, penicillamine, hydralazine, L-Dopa and cycloserine interfere with PLP reacting with the carbonyl groups (Baghavan 1985; Weir, Keniston et al. 1991). The requirements of vitamin B₆ increase in eclampsia and preeclampsia (Brophy and Siiteri 1975; Shane 1980) and haemodialysis. B₆-dependent syndromes, which require pharmacological doses of the vitamin, are seldom. These include

cystathionine- β -synthase deficiency, PN dependent anemias (especially sideroblastic anemia), and homocystinuria. Treatment consists of very high pharmacological doses of PN (Bassler 1988). Supplementation of PN hydrochloride in various medical conditions and their doses are shown in table 4.

2.) Preventive treatment of borderline, subclinical deficiency

There are some studies showing that especially in the elderly there is a high prevalence of deficient or borderline vitamin B₆ status (Haller, Lowik et al. 1991; Herrmann and Knapp 2002). Since a subclinical vitamin B₆ deficiency has been associated to several chronic diseases especially in the elderly, a supplementation in this group seems to be indicated. While vitamin B₆ supplementation is an effective treatment for lowering excessively high Hcy levels in patients with PN-responsive homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency (Dudman, Wilcken et al. 1993; Franken, Boers et al. 1994), its role in the prevention or treatment of mild hyperhomocysteinemia remains unclear. Results of 11 studies (Wilcken, Gupta et al. 1981; Brattstrom, Israelsson et al. 1988; Brattstrom, Israelsson et al. 1990; Arnadottir, Brattstrom et al. 1993; Ubbink, Vermaak et al. 1994; Bostom, Gohh et al. 1997; Dierkes, Kroesen et al. 1998; Lakshmi and Ramalakshmi 1998; Bronstrup, Hages et al. 1999; Mansoor, Kristensen et al. 1999; Bosy-Westphal, Holzapfel et al. 2001; McKinley, McNulty et al. 2001) that investigated the effect of vitamin B₆ on fasting plasma Hcy concentrations are inconclusive. Seven of the aforementioned studies (Wilcken, Gupta et al. 1981; Brattstrom, Israelsson et al. 1988; Brattstrom, Israelsson et al. 1990; Ubbink, Vermaak et al. 1994; Bostom, Gohh et al. 1997; Dierkes, Kroesen et al. 1998; Lakshmi and Ramalakshmi 1998; Bosy-Westphal, Holzapfel et al. 2001) found no change in fasting Hcy, and one found a significant increase (Arnadottir, Brattstrom et al. 1993). Some studies found a significant reduction in fasting Hcy after vitamin B₆ supplementation (Bronstrup, Hages et al. 1999; Mansoor, Kristensen et al. 1999; McKinley, McNulty et al. 2001). The first of these studies, carried out in young women who had clinical and biochemical vitamin B₆ deficiency, found a significant lowering of fasting Hcy of 19.7% after 15 days of treatment with 20 mg PN hydrochloride/day (Mansoor, Kristensen et al. 1999). The trial, however, was not blinded or placebo-controlled and had no washout period. The

second study, a recent placebo-controlled trial, showed a significant lowering of fasting Hcy of 17% ($p < 0.011$) in response to extremely large doses (120 mg/day) of vitamin B₆ in healthy subjects (Bronstrup, Hages et al. 1999). McKinley *et al.* found that in healthy elderly persons who are folate and riboflavin replete, low-dose vitamin B₆ supplementation (1.6 mg/day) effectively lowers fasting Hcy levels by 7.5% ($p < 0.008$) (McKinley, McNulty et al. 2001). Since there is more than one vitamin involved in Hcy metabolism, most intervention trials use a combination supplement containing folic acid, vitamin B₁₂, and vitamin B₆ (McKay, Perrone et al. 2000; Henning, Tepel et al. 2001; Schnyder, Roffi et al. 2002) and therefore it is somewhat difficult to conclude the effect of a single vitamin.

Prevention of B₆ deficiency

Dietary reference intakes (DRI)

According to data from nationally representative U.S. surveys, the median daily intake of B₆ by men is approximately 2 mg/day and the median intake by women is approximately 1.5 mg/day. German data show the same pattern (Ernährung 2004). This indicates that the general population is not at risk for developing clinical vitamin B₆ deficiency.

Further, the new DRIs set by different international organisations, are now taking into account new aspects to estimate requirements. They do not only focus on the prevention of clinical deficiency, but try to take into account health effects that certain nutrients might have. Even though there is evidence that vitamin B₆ could help to prevent CVD, certain types of cancer, and cognitive impairment, present data are insufficient to set EARs based on these new aspects. DRIs and DACH reference values for vitamin B₆ are summarised in table 5. The recommended dietary allowance (RDA) for adults is 1.3 mg food vitamin B₆/day, which lies in the same range as the DACH-settings for men and women, 1.5 and 1.2 mg, respectively (DACH 2000). Most studies of B₆ requirements have focused on adults and have been depletion-repletion studies. Clinical symptoms of vitamin B₆ deficiency have only been observed during depletion with very low levels of B₆ and have never been seen at intakes of 0.5 mg/day or more, suggesting that an intake of 1 mg/day is sufficient for most adults

(Board 1998). The current RDA (1998) for older adults and elderly people (age > 51) are set higher than for younger adults, based on the results of several repletion-depletion studies. Ribaya-Mercado and coworkers employed a vitamin B₆ depletion-repletion protocol in healthy elderly and showed that higher than RDA (1989: men: 2.0 mg/day, women: 1.6 mg/day) intakes were necessary to normalise several parameters of vitamin B₆ status including enzyme activity, tryptophan metabolism, and plasma vitamers. In a related series of experiments, the amount of vitamin B₆ essential to restore several immunologic indices (lymphocyte number and percentages, mitogenic responses, and IL-2 production) to baseline values was also greater than the current DRI (1998) (Meydani, Ribaya-Mercado et al. 1991). Higher levels of fasting insulin and plasma glucose were also observed during the periods of low vitamin B₆ status (Ribaya-Mercado 1990). Despite evidence that the requirement for vitamin B₆ may be slightly higher in older adults, several surveys have found that over half of individuals over age 60 consume less than the current DRI (1.7 mg/day for men and 1.5 mg/day for women). Several studies have found elderly populations to have plasma PLP concentrations below the cut-off threshold for deficiency (Russell 1992). A high prevalence of marginal vitamin B₆ deficiency in the elderly is reflected by their reduced activity of α -EAST and α -EALT, increased excretion of XA, and lowered levels of PLP and plasma total vitamin B₆ (Hamfelt 1964; Kant, Moser-Veillon et al. 1988; Lowik, van den Berg et al. 1989). While 50 to 90% of older adults are reported to have dietary intakes of vitamin B₆ below 1989 RDA levels, several studies indicate that the physiologic requirement may exceed these recommended values (Hoorn, Flikweert et al. 1975; Vir 1977). Considering this, it is not understandable why the DACH reference values are not set higher for older adults (> 51 years) or even lower for men of the age 71 and older.

Food fortification

The possibility to enrich food with vitamins allows it to increase the health status of the population. The United States and Canada started with the first official guidelines concerning the fortification of food with folic acid. Further, Hungary and Chile followed the guidelines and voluntary fortification is present in Switzerland, Australia and Great Britain. Due to the interrelationship of the vitamins

that participate in the Hcy cycle, it has been debated if vitamin B₆ (and vitamin B₁₂) should be added to folate-enriched foods. From the different countries that enrich their flour with folate, only in Hungary vitamin B₆ is added (880 µg/100 g flour) beside vitamin B₁₂ with 0.8 µg and folic acid with 160 µg (Czeizel and Merhala 1998).

Toxicity

Values of maximum tolerable intakes are summarised in table 5. As a water-soluble vitamin which is rapidly metabolised and excreted, B₆ might be expected to have low toxicity. In fact, no adverse effects have been associated with high intake of vitamin B₆ from food sources. Schaumburg and others reported the development of severe sensory neuropathy in 7 patients treated with 2 - 6 g of PN hydrochloride/day (Schaumburg, Kaplan et al. 1983). Further, reports of peripheral sensory neuropathy associated with high-dose PN therapy (1 to 4 g/day) appeared also in the 1980s (Bear 1984; Bredesen 1984; de Zegher, Przyrembel et al. 1985; Friedman, Resnick et al. 1986). However, it is noteworthy that none of the reviews of patients with vitamin B₆ dependency syndromes, who are treated with 500 - 1500 mg/day, mentions the development of peripheral neuropathy (Sturman 1986). Some patients developed abnormally low plasma concentrations of PLP after high doses of vitamin B₆. This rebound avitaminosis presumably reflects induction of pyridoxal oxidase, and hence increased catabolism of the vitamin. Within 4 months, plasma concentrations of the vitamin return to normal without supplementation (Dalton and Dalton 1987). The limited data involving lower PN doses reveal that the risk of developing sensory neuropathy decreases rapidly at doses below 1 g/day (Del Tredici 1985; Bernstein 1988). The safe upper limit for vitamin B₆ has been set at 100 mg/day, taking into account a security factor of 5, because the lowest dose at which toxicity (sensory neuropathy) has been observed is 500 mg/day (Board 1998).

TABLES:

Table 1 Parameter for assessment of vitamin B₆ status and reference values (modified by Leklem, 1994)

Parameter		Reference value
<i>Direct</i>	Plasma PLP	> 30 nmol/L/ 20 nmol/L
	Total vitamin B ₆	> 40 nmol/L
	Urinary 4-PA excretion	> 3 μmol/day
	Urinary total vitamin B ₆	> 0.5 μmol/day
<i>Indirect</i>	α-EAST	< 1.8 (< 80 %)
	α-EALT	< 1.25 (< 25 %)
	XA excretion (2g L-try)	< 65 μmol/day
	Cystathionine excretion (3 g L-Methionine)	< 350 μmol/day

Table 2 Parameters by which PLP concentration is influenced (modified after Leklem, 1994)

	Parameter	Plasma-PLP
Nutrition	↑ vitamin B ₆	↑
	↑ protein	↓
	↑ glucose	↓, acute
	↓ bioavailability	↓
Physiology	↑ physical activity, aerobic	↑, acute
	↑ age	↓
	pregnancy	↓
	↑ activity of alkaline phosphatase	↓
	Smoking	↓
	Hypophosphatasia	↑

Table 3 Conditions that increase risk for PN deficiency

Advanced age	
Medical conditions	
Severe malnutrition	
Hospitalization	
Celiac disease	
Hepatitis and extrahepatic biliary obstruction	
Hepatocellular carcinoma	
Chronic renal failure	
Kidney transplant	
Hyperoxaluria types I and II	
High serum alkaline phosphatase level, such as in cirrhosis and tissue injury	
Catabolic state	
Medical procedures	
Hemodialysis	
Peritoneal dialysis	
Phototherapy for hyperbilirubinaemia	
Social-behavioral conditions	
Excessive alcohol ingestion (except for pyridoxine-supplemented beer)	
Tobacco smoking	
Severe malnutrition	
Other risk factors	
Poisoning, such as Gyromitra mushroom poisoning	
Perinatal factors, such as pyridoxine-deficient mother	
Inherited conditions, such as pyridoxine dependent neonatal seizures	
Other patient history	
Sideroblastic anemia	
Pregnancy	
Physical exercise	
Drug-interaction	Mechanism of interaction
Isoniazid (hydrazines)	Reacts with PL and PLP
Cycloserine	Reacts with PLP, forms oxime
L-3,4-Dihydroxyphenlalanine derivative	Reacts with PLP, forms tetrahydroquinoline derivative
Penicillamine	Reacts with PLP, forms thiazolidine
Ethinylestradiol, mestranol	Increased enzyme levels and retention of PLP in tissue
Ethanol	Increased catabolism of PLP
Theophylline, caffeine	Inhibition of pyridoxal kinase

Table 4 Supplementation of PN hydrochloride in various medical conditions (Frye, 2002).

Medical conditions	doses
Cirrhosis	50 mg/day
Hemodialysis	5-50 mg/day
Peritoneal dialysis	2.5-5 mg/day
Chronic renal failure	2.5-5 mg/day
Sideroblastic anemia	50-600 mg/day
PN-dependent seizures	100 mg/day
Homocystinuria	100-500 mg/day
Homocysteinemia	100-500 mg/day
<i>Gyromitra</i> poisoning	25 mg/kg
Prophylactic administration should be provided when using: isoniacid penicillamine	30-450 mg/day 100 mg/day
Estrogen-induced reduction in tryptophan metabolism may require supplementation	20-25 mg/day

Table 5 DRIs and DACH-Reference Values

	<i>DRI</i>			<i>DACH-Reference Values</i>	
Age	Vitamin B6 (mg/day)			Age	Vitamin B ₆ (mg/day)
	EAR ^a	RDA ^b /AI *	UL ^c		Men/Women
	Men/Women	Men/ Women			Men/Women
0-6 months	-	0.1 (≈ 0.014mg/kg)*	-	0-4 months	0.1
7-12 months	-	0.3 (≈ 0.033mg/kg)*	-	4-12 months	0.3
1-3 years	0.4	0.5	30	1-4 years	0.4
4-8 years	0.5	0.6	40	4-7 years	0.5
9-13 years	0.8	1.0	60	7-10 years	0.7
14-18 years	1.1/1.0	1.3/1.2		10-13 years	1.0
19-30 years	1.1/1.3	1.3	80	13-15 years	1.4
31-50 years	1.1/1.3	1.3		15-19 years	1.6/1.2
51-70 years	1.4/1.3	1.7/1.5	100	19-25 years	1.5/1.2
> 70 years	1.4/1.3	1.7/1.5	100	25-51 years	1.5/1.2
Pregnancy	-/1.6	1.9	100	51-65 years	1.5/1.2
Lactation	-/1.7	2.0	100	> 65 years	1.4/1.2
			100 ¹	Pregnancy	1.9
			100 ¹	Lactation	1.9

^a Estimated average requirement

^b Recommended dietary allowances

^c Upper level of safe intake; intake of vitamin B₆ as pyridoxine

* Adequate Intake

¹ >19 years; < 19 years: 80 mg/day

Table 6 Food sources of PN (vitamin B₆) (modified after Elmadfa *et al.*, 1998)

Food	Content(mg/100g)
Meat	
Beef liver	0.90
Pork	0.39
Chicken	0.50
Beef	0.50
Fish	
Salmon	0.98
Tuna	0.46
Eggs and Dairy	
Egg	0.12
Whole milk	0.05
Cream cheese (20%)	0.09
Vegetables	
Spinach, raw	0.20
Potatoes, raw	0.21
Peas, green, raw	0.16
Broccoli, raw	0.17
Carrots	0.30
Fruits	
Apple, unpeeled, raw	0.10
Banana, raw	0.37
Grapes, raw	0.13
Walnuts	0.87
Cereals	
Wheat germ	4.00
Wheat flour, whole grain	0.46
Rye bread	0.20
Bread, white	0.04
Rice, white	0.18
Rice, brown	0.67
Miscellaneous	
Spaghetti with tomato sauce	0.12
Pizza, all kinds	0.41
Pancakes	0.02
Yeast	0.81
Human milk	0.01

FIGURES:

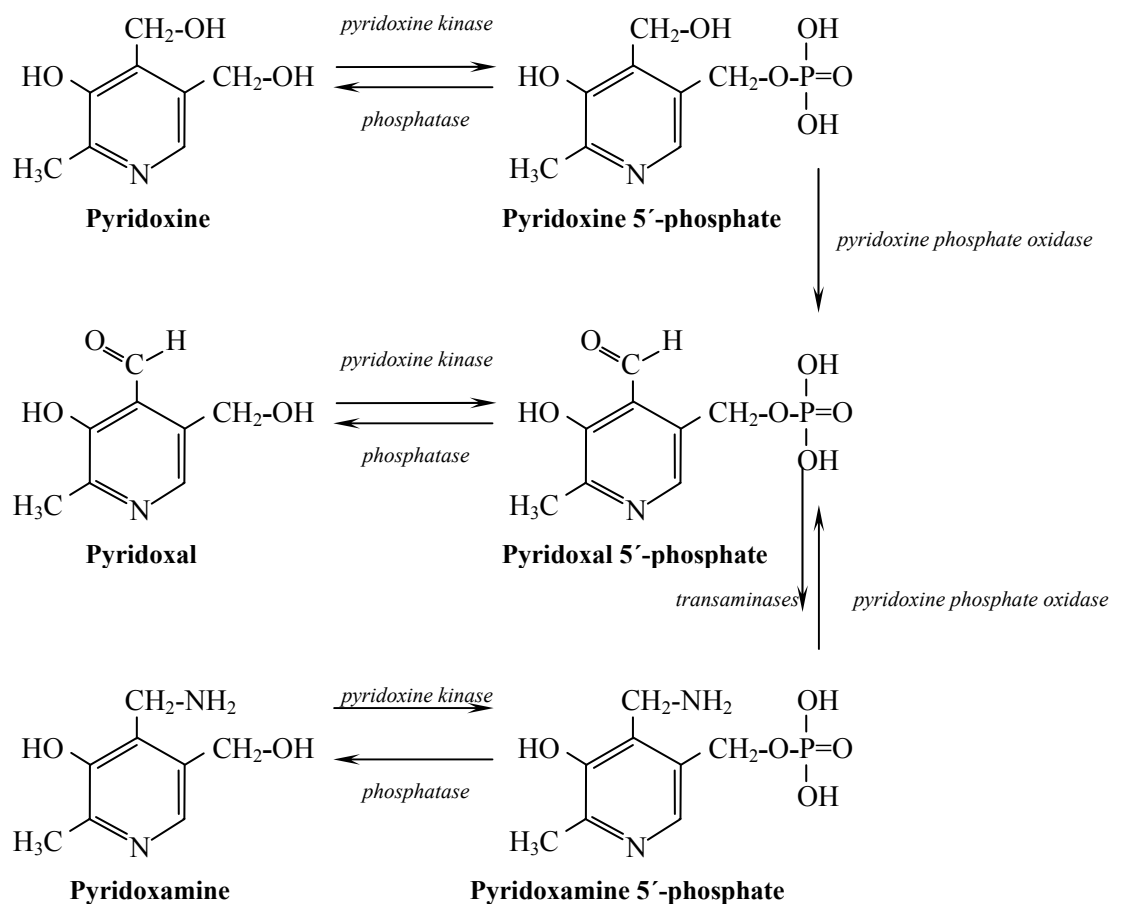


Figure 1 Metabolic inter-conversion of pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine and their respective phosphate esters. (modified after Bässler, 2002)

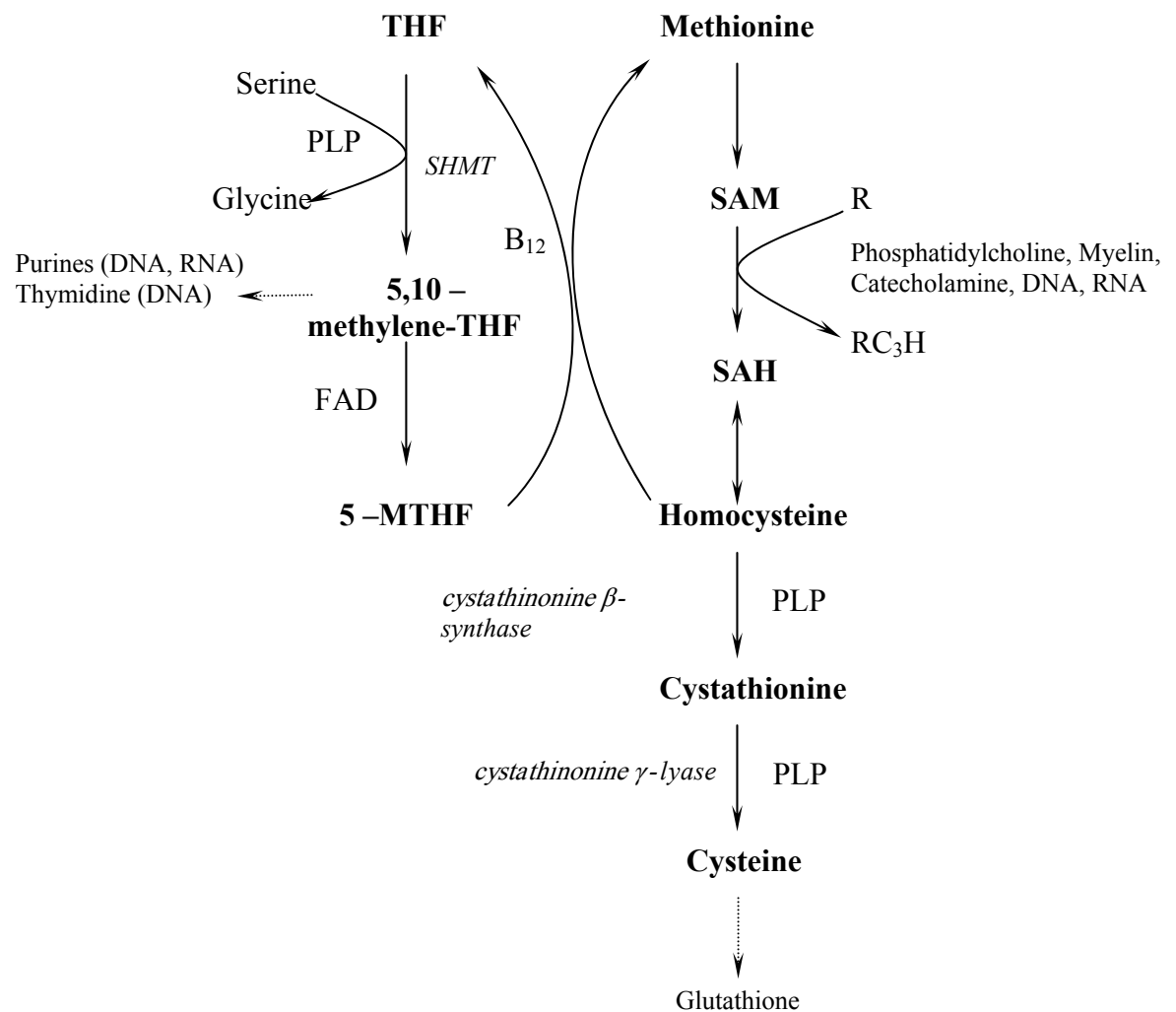


Figure 2 One-carbon unit generation and Hcy metabolism. Vitamin B₆ is involved as coenzyme PLP. PLP: Pyridoxal 5'-phosphate; SAM: S-adenosylmethionine; SAH: S-adenosylhomocysteine; SHMT: Serine-hydroxymethyltransferase; THF: tetrahydrofolate; 5-MTHF: 5-methyl tetrahydrofolate; R: methyl group acceptor.

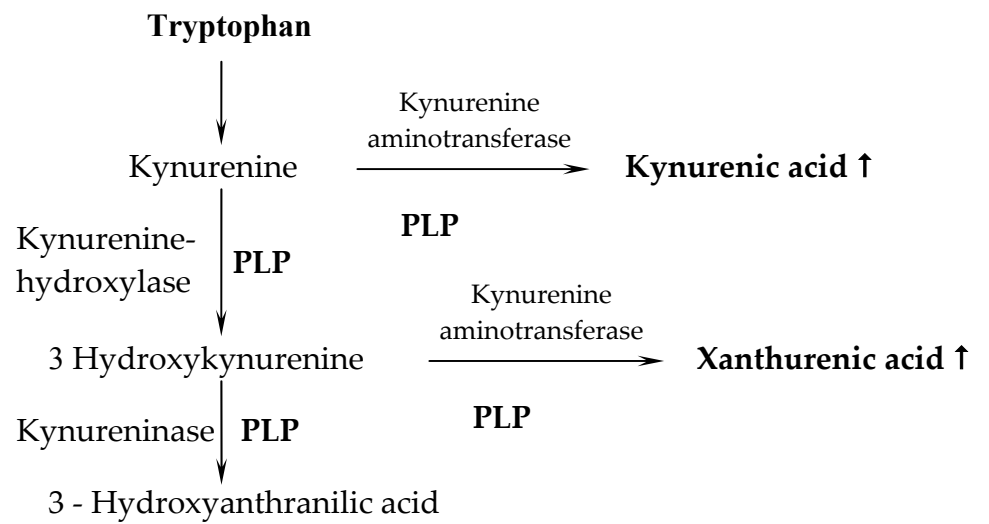


Figure 3 Tryptophan load test. PLP: pyridoxal 5'-phosphate.

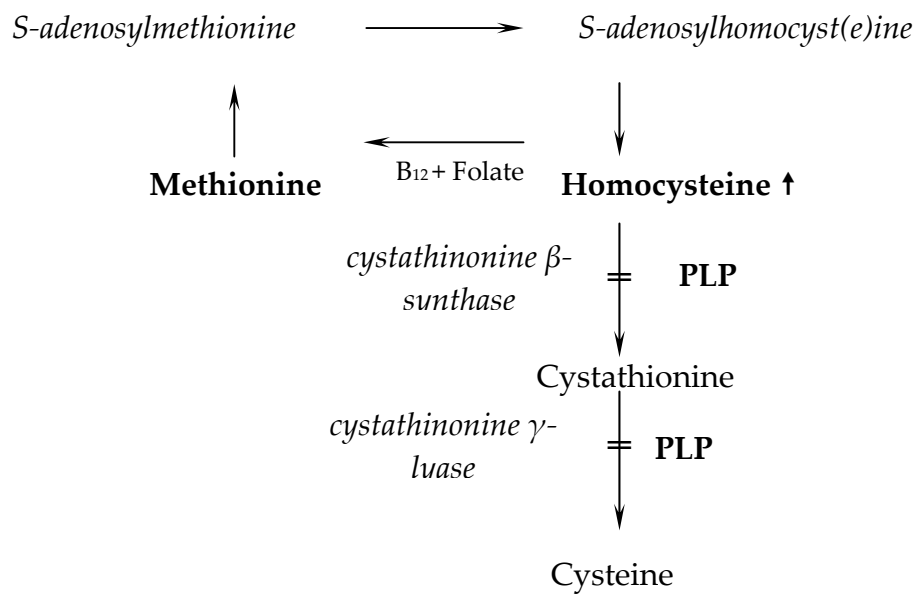


Figure 4 Methionine load test. PLP: pyridoxal 5'-phosphate

REFERENCES:

Snell, E. E. (1958). Some aspects of the metabolism of vitamin B6. Fourth international Congress of Biochemistry-Vitamin Metabolism. New York, Pergamon: 250-265.

Stabler, S. P., Sampson, D.A., Wang, L.P., Allen, R.H. (1997). "Elevations of serum cystathionine and total homocysteine in pyridoxine-, folate-, and cobalamin-deficient rats." *J Nutr Biochem* **8**: 279-289.

Stampfer, M. J., M. R. Malinow, et al. (1992). "A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians." *Jama* **268**(7): 877-81.

Stephens, M. C., V. Havlicek, et al. (1971). "Pyridoxine deficiency and development of the central nervous system in the rat." *J Neurochem* **18**(12): 2407-16.

Stoerk, H. C. (1946). "Effects of calcium deficiency and pyridoxine deficiency on thymic atrophy (accidental involution)." *Proc Soc Exp Biol Med* **62**: 90-96.

Stoerk, H. C., Eisen, H.N. (1946). "Suppression of circulating antibodies by pyridoxine deficiency." *Proc Soc Exp Biol Med* **62**: 88-89.

Stolzenberg-Solomon, R. Z., D. Albanes, et al. (1999). "Pancreatic cancer risk and nutrition-related methyl-group availability indicators in male smokers." *J Natl Cancer Inst* **91**(6): 535-41.

Sturman, J. A. (1981). Vitamin B6 and sulphur amino acid metabolism. *Methods in vitamin B6 nutrition, analysis and status assessment*. J. E. Leklem, Reynolds, R.D. New York, Plenum Press: 341-373.

Sturman, J. A. (1986). Vitamin B6 and sulphur amino acid metabolism, inborn errors, brain junction, deficiency and megavitamin therapy. *Vitamin B6 (pyridoxal phosphate): chemical, biochemical and medical aspects, Part B*. New York, Wiley Interscience: Chapter 16, 507-572.

Talbott, M. C., L. T. Miller, et al. (1987). "Pyridoxine supplementation: effect on lymphocyte responses in elderly persons." *Am J Clin Nutr* **46**(4): 659-64.

Ubbink, J. B., W. J. Vermaak, et al. (1994). "Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans." *J Nutr* **124**(10): 1927-33.

- Ueland, P. M. and H. Refsum (1989). "Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy." *J Lab Clin Med* **114**(5): 473-501.
- Valle, D., G. G. Pai, et al. (1980). "Homocystinuria due to a cystathionine beta-synthase deficiency: clinical manifestations and therapy." *Johns Hopkins Med J* **146**(3): 110-7.
- Vasdev, S., Longerich, L., Singal, P. (2002). "Nutrition and hypertension." *Nutr Res* **22**: 111-123.
- Verhoef, P., M. J. Stampfer, et al. (1996). "Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B6, B12, and folate." *Am J Epidemiol* **143**(9): 845-59.
- Victor, M. and R. D. Adams (1956). "The neuropathology of experimental vitamin B6 deficiency in monkeys." *Am J Clin Nutr* **4**(4): 346-53.
- Vir, S. C., Love, A.H.G. (1977). "Vitamin B6 status of institutionalized and non-institutionalized aged." *Int J Vitam Nutr Res* **47**: 364-372.
- Wasynczuk, A., A. Kirksey, et al. (1983). "Effects of maternal vitamin B-6 deficiency on specific regions of developing rat brain: the extrapyramidal motor system." *J Nutr* **113**(4): 746-54.
- Wei, E. K., E. Giovannucci, et al. (2005). "Plasma vitamin B6 and the risk of colorectal cancer and adenoma in women." *J Natl Cancer Inst* **97**(9): 684-92.
- Weir, M. R., R. C. Keniston, et al. (1991). "Depression of vitamin B6 levels due to dopamine." *Vet Hum Toxicol* **33**(2): 118-21.
- Welch, G. N. and J. Loscalzo (1998). "Homocysteine and atherothrombosis." *N_Engl J Med* **338**(15): 1042-50.
- Wilcken, D. E., V. J. Gupta, et al. (1981). "Homocysteine in the plasma of renal transplant recipients: effects of cofactors for methionine metabolism." *Clin Sci (Lond)* **61**(6): 743-9.
- Wozenski, J. R., J. E. Leklem, et al. (1980). "The metabolism of small doses of vitamin B-6 in men." *J Nutr* **110**(2): 275-85.
- Wu, K., K. J. Helzlsouer, et al. (1999). "A prospective study on folate, B12, and pyridoxal 5'-phosphate (B6) and breast cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**(3): 209-17.

Zhang, S. M., W. C. Willett, et al. (2003). "Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, homocysteine, and risk of breast cancer." *J Natl Cancer Inst* **95**(5): 373-80.

Zhang, Z. F., R. C. Kurtz, et al. (1997). "Adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia: the role of diet." *Nutr Cancer* **27**(3): 298-309.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha llevado a cabo siguiendo escrupulosamente las normas deontológicas reconocidas en la Declaración de Helsinki 1996 (revisión de Edimburgo 2000), Convenio de Oviedo y siguiendo las recomendaciones de Buena Práctica Clínica de la CEE (documento 111/3976/88 de julio de 1990) y la normativa legal vigente española que regula la investigación clínica en humanos (Real Decreto 561/1993 sobre ensayos clínicos). El protocolo ha sido sometido al comité de ensayos clínicos de la institución y se requerirá la firma de un documento de consentimiento informado para participar. En los casos que sea necesario, dicho documento será firmado por familiares o persona más allegada.

El contenido de los cuadernos de recogida de datos, así como los documentos generados durante todo el estudio, están protegidos de usos no permitidos por personas ajenas a la investigación. Por tanto, la información generada en este ensayo será considerada estrictamente confidencial, permitiéndose, sin embargo, su inspección por las Autoridades Sanitarias.

A título informativo se les suministrará la información obtenida de manera individual a cada interesado.

TAMAÑO DE LA MUESTRA:

La muestra objeto del presente estudio se compone de un total de 218 ancianos, 82 hombres y 136 mujeres, con edades comprendidas entre los 58 y 104 años (media 79 ± 8). El estudio se realizó entre 2002 y 2004.

Todos los ancianos estaban institucionalizados en la residencia "La Milagrosa" de Armilla, institución perteneciente a la Excelentísima Diputación de Granada.

La valoración se realizó mediante estudios dietéticos, bioquímicos, y hematológicos.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Sujetos mayores de 60 años que vivían en la residencia por lo menos desde hace un año.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron:

- Todos los sujetos en tratamiento vitamínico (vitamina B₁₂, vitamina B₆ y folatos).
- Pacientes con insuficiencia renal crónica.
- Enfermedades tiroideas.

MÉTODOS:

ESTUDIO HEMATOLÓGICO Y BIOQUÍMICO

Este estudio se realizó en un total de 218 ancianos, 82 hombres y 136 mujeres que se prestaron voluntariamente a la extracción venosa.

Las muestras de sangre se recogieron tras ayuno de doce horas, a primera hora de la mañana, por punción de la vena cubital. Parte de la sangre se recogió en vacutainers con EDTA, heparina, citrato y en tubos sin anticoagulante para la obtención de suero. Inmediatamente después de la venopunción los tubos sin anticoagulante, se trasladaron en baño de hielo antes de una hora al laboratorio para su proceso.

Con la sangre, procedente de los tubos anticoagulados con EDTA, se realizaron las siguientes determinaciones:

- a. Hemograma completo.
- b. Recuento de reticulocitos porcentuales y en valores absolutos mediante el analizador Coulter Gen de Isaza.
- c. Se realizaron dos frotis sanguíneos para comprobación óptica de la fórmula leucocitaria y contar la segmentación de los neutrófilos con el fin de calcular el índice de lobularidad (IL) de cada muestra.
- d. Se extrajo ADN mediante la técnica de Qiagen, procedimiento descrito por Higuchi (1989), el ADN obtenido, se congeló a menos 80° C en dos alícuotas para posteriormente hacer el estudio del polimorfismo de la mutación C677T de la MTHFR mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior digestión y amplificación con la enzima de restricción Hinf-I (GE Healthcare) como fue descrito por Frosst et al (1995).

- e. 200 microlitros de sangre total se hemolizaron con hemplysate reagent para la determinación del folato intraeritrocitario, la muestra se procesó inmediatamente o se congeló a menos 30° C para su análisis posterior, siempre antes de 1 semana.
- f. Se dosificó las hemoglobinas A₂ y fetal en las muestras con microcitosis o anemia microcítica no ferropénica.

Con la sangre procedente del tubo anticoagulado con Heparina lio se separaron dos alícuotas de 1 cc de sangre total para la determinación de la vitamina B₆. las muestras se congelaron a menos 80° C hasta su análisis.

Los tubos sin anticoagulante conservados en baño de hielo desde la extracción de la sangre, se centrifugaron en centrifuga refrigerada antes de una hora de la extracción y se separaron las siguientes alícuotas:

- a. 400 microlitros para la determinación de Homocisteína, esta se analizó inmediatamente o se congeló a menos 30°C hasta su análisis.
- b. 1000 microlitros para la determinación de la Holotranscobalamina II, se congelaron a menos 30° C hasta su análisis-
- c. 1000 microlitros para las determinaciones bioquímicas que se analizaron inmediatamente.
- d. 1000 microlitros para las determinaciones de vitamina B₁₂ y folato sérico, las muestras se analizaron inmediatamente o se congelaron a menos 30° C hasta su análisis.
- e. 1000 microlitros para las determinaciones del metabolismo férrico, transferrina, ferritina, receptores solubles de la transferrina y haptoglobina, estas muestras se analizaron inmediatamente. Hitachi 900 (Roche)

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Hemograma completo:

La sangre anticoagulada con EDTA se procesó en el analizador ADVIA 120 de Bayer. Se determinaron los siguientes parámetros:

Leucocitos
Hematíes
Hemoglobina
VCM (volumen corpuscular medio)
HCM (hemoglobina corpuscular media)
CHCM (concentración de hemoglobina corpuscular media)
ADE (índice de dispersión eritrocitaria)

Plaquetas
VPM (volumen plaquetario medio)

Fórmula leucocitaria en valores porcentuales y absolutos con recuento de neutrófilos, linfocitos, monolitos, eosinófilos, basófilos y LUC.

Se realizaron dos frotis sanguíneos con los que comprobó óptimamente la fórmula leucocitaria y se contó la segmentación neutrófila para hallar el índice de lobularidad (IL).

Índice de lobularidad:

En cada uno de los frotis sanguíneos, una vez secados al aire, se fijaron con metanol absoluto y se tiñeron con Giemsa, se contaron 100 neutrófilos segmentados y se clasificaron en 2, 3, 4, 5, 6 y 7 segmentos, la cifra hallada de cada uno de ellos, se multiplicó por los segmentos correspondientes, es decir por 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente, la cifra hallada se dividió entre 100 con lo que se obtuvo el índice de lobularidad (IL).

$$IL \% = (2L \times 2 + 3L \times 3 + 4L \times 4 + 5L \times 5 + 6L \times 6 + 7L \times 7) / 100$$

También se consignó la suma de neutrófilos con 5 lóbulos ó más.

Índice de reticulocitos:

La prueba se realizó con sangre anticoagulada con EDTA en el Coulter modelo Gen-S, obteniéndose los reticulocitos porcentualmente

y en valores absolutos. (Valores de normalidad en nuestro laboratorio 0.5-1.5 % o 24-85.000 mmcc)

Velocidad de sedimentación globular:

Se realizó con el vacutainers anticoagulado con citrato en el analizador automático SED System de Becton Dickinson. (Valores de normalidad en nuestro laboratorio para la 1ª hora menor de 20 mm/hora para hombres e inferior a 30 mm/hora para las mujeres).

Cromatografía de hemoglobinas:

Una muestra de 10 microlitros de sangre total anticoagulada con EDTA se hemolizó con 1000 microlitros de agua destilada, analizándose posteriormente en el Hb Gold de los laboratorios Menarini. (Valores de normalidad en nuestro laboratorio para la hemoglobina A₂ < 3.5 % y para la hemoglobina F < 0.5 %)

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS-HEMATOLÓGICOS

Parámetros indicadores del metabolismo férrico:

Hierro sérico:

Se determinó por método colorimétrico que se realiza en tres pasos: primero en medio ácido se separa el hierro de la transferrina, reducción del hierro férrico a ferroso mediante el ascorbato y por último los iones ferrosos reaccionan con un cromógeno el FerroZine para formar un complejo cromático. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración férrica y se mide fotométricamente en el autoanalizador Hitachi 911 de Roche. (Webster, 1960) (CV.= 1.2%) (Valores de normalidad del laboratorio 45-150 µg/dl), para el control de calidad interno se utilizaron Precinorm universal y Precipath universal de Roche.

Transferrina:

Se determinó por método inmunoturbidimétrico. Los anticuerpos anti-transferrina reaccionan con el antígeno de la muestra

formando un complejo antígeno-anticuerpo que se mide turbidimétricamente después de la aglutinación en el autoanalizador Hitachi 911 de Roche. La adición de PEG posibilita alcanzar un rápido punto final y aumentar la sensibilidad (1,2) (CV.= 1,1%) (Valores de normalidad del laboratorio 200-360 mg/dl), para el control de calidad interno se utilizaron Precinorm proteínas y Precipath proteínas de Roche.

Índice de saturación de la transferrina (IST):

Se obtiene por cálculo matemático con la siguiente formula:

$$\text{IST} = (\text{Hierro sérico} \times 100) / (1,39 \times \text{Transferrina})$$

(Valores de normalidad en nuestro laboratorio 20-30%).

Ferritina:

Se determino por método inmunturbidimétrico. Los anticuerpos anti-ferritina fijados a látex reaccionan con el antígeno de la muestra formando un complejo antígeno-anticuerpo que se mide después de la aglutinación por turbidimetría en el autoanalizador Hitachi 911 de Roche (1,3) (CV.= 5.6%).

(Valores de normalidad del laboratorio 15-350 µg/ml), para el control de calidad interno se utilizaron Precinorm proteínas y Precipath proteínas de Roche.

Receptores solubles de la transferrina (sTfR):

Los anticuerpos anti-sTfR fijados a látex reaccionan con el antígeno de la muestra formando un complejo antígeno-anticuerpo que se mide después de la aglutinación por turbidimetría en el autoanalizador Hitachi 911 de Roche (1,4), (CV.= 2.76%) (Valores de normalidad del laboratorio 2.5-4.5 mg/l), para el control de calidad interno se utilizaron Precinorm proteínas y Precipath proteínas de Roche.

Parámetros indicadores de hemólisis

Haptoglobina:

Los anticuerpos anti-haptoglobina reaccionan con los antígenos de la muestra formando un complejo antígeno-anticuerpo que se mide turbidimétricamente en el autoanalizador Hitachi 911 de Roche (1,5) (CV.= 1.4%) (Valores de normalidad del laboratorio 30-200 mg/dl), para el control de calidad interno se utilizaron Precinorm proteínas y Precipath proteínas de Roche.

LDH:

Método cinético enzimático que se realiza en el autoanalizador BH/Hitachi 917, utilizándose controles y calibradores de Roche. (CV.= 4.5.0%) (Valores de normalidad del laboratorio 230-460 U/l).

Test directo de la antiglobulina:

Método manual que utiliza hematíes procedentes del tubo anticoagulado con EDTA y lavados tres veces con suero salino (ClNa 9‰), se decanta cada vez el sobrenadante, enfrentado una gota de hematíes lavados con una gota de antiglobulina polivalente, la aglutinación demuestra la presencia de autoanticuerpos (Coombs, Mourant y Race 1945).

Test indirecto de la antiglobulina:

Método manual que utiliza suero. En un tubo de hemólisis se añaden tres gotas del suero a estudiar al que se le añade una gota de hematíes testigo, la mezcla es incubada durante media hora en baño maría a 37°C durante 1 hora, los hematíes ya sensibilizados se lavan tres veces con solución salina (ClNa 9‰), decantando cada vez el sobrenadante, al resto se añade antiglobulina polivalente, se centrifuga a 5000 rpm durante 30 segundos y se ve la presencia o no de aglutinación. (Coombs, Mourant y Race 1945)

Parámetros indicadores del status vitamínico

Cianocobalamina (Vitamina B₁₂):

Técnica de enzimoimmunoensayo que utiliza la tecnología de microparticulas (MEIA) en el autoanalizador IMx de los laboratorios Abbott. Las microparticulas recubiertas de factor intrínseco se unen a la B₁₂ de la muestra tratadas con NaOH y KCN formando un complejo factor intrínseco-B₁₂, posteriormente se añade un conjugado B₁₂ fosfatasa alcalina formándose un complejo entre el conjugado y las microparticulas recubiertas de factor intrínseco, se añade un sustrato el 4-metilumbeliferona fosfato y el producto fluorescente resultante se mide por un sistema óptico MEIA. (6). (CV.=3.9%)(Valores de normalidad en nuestro laboratorio 179-1132 pg/ml)

Folato sérico:

Técnica de enzimoimmunoanálisis de fluorescencia, en este método, la matriz de fibra de vidrio de la celdilla de reacción se ha recubierto de un compuesto de amonio cuaternario de elevado peso molecular, que confiere una carga positiva y capacidad de capturar compuestos de carga negativa. Durante el análisis, se forman complejos cargados negativamente, utilizando un reactivo de afinidad soluble compuesto de una proteína folato-ligante unida a anticuerpos monoclonales y ligados a su vez a carboxi-metil-celulosa. En nuestro laboratorio se utilizó un método automatizado de inmunoanálisis de fluorescencia polarizada comercializado por IMX Abbott. (CV=4 %) (Valores normalidad en nuestro laboratorio > 6 ng/ml)

Folato intraeritrocitario:

Es la misma técnica del folato sérico previa hemolisis de los hematíes por medio de un reactivo hemolizante proporcionado por el laboratorio Abbott (CV=4,6 %) (Valores de normalidad en nuestro laboratorio >375 ng/ml)

Piridoxina (Vitamina B₆):

Técnica cromatográfica líquida de alta resolución. Previa separación con ácido tricloroacético de las vitaminas a las proteínas a

las que van unidas, se introduce la muestra en el sistema HPLC, midiendo la concentración de la vitamina mediante un detector de fluorescencia. Esta técnica se realizó por nuestro grupo de investigación en Bonn (Alemania). (Valores de normalidad de nuestro laboratorio > 20 nmol/l).

Homocisteína:

Técnica de inmunoanálisis de polarización de la fluorescencia (FPIA) que utiliza el autoanalizador IMx de los laboratorios Abbott la Homocisteína en forma oxidada se reduce a Homocisteína libre y esta se convierte enzimáticamente en S-adenosil-L-Homocisteína (SAH), se añade un anticuerpo monoclonal, la SAH y el trazador marcado con fluoresceína compiten por los sitios de unión del anticuerpo monoclonal, la intensidad de la luz polarizada se mide con el sistema óptico FPIA. (CV.=1.9%) (Valores de normalidad en nuestro laboratorio 5-12 μ mol/l).

Holotranscobalamina II (Holo-TC-II):

Técnica de radioinmunoanálisis (RIA), cedida para esta tesis por el laboratorio Axis-Shield (HoloTC RIA. Art 1114208), utiliza suero y que mide la vitamina B₁₂ ligada a la Transcobalamina II. (CV < 20 %)(Valores de normalidad de nuestro laboratorio > 45 pmol/l)

Ácido Metilmalónico:

Técnica realizada por nuestro grupo en Bonn (Alemania). Fue analizado por MS-GC. (Valores de normalidad inferiores a 300 nmol/l).

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS:

Parámetros lipídicos

Colesterol total:

Test enzimático colorimétrico (Kit Chop-PAP) comercializado por Roche que utiliza suero y se realiza en el autoanalizador BH/Hitachi

917, utilizándose controles y calibradores de Roche. (CV.= 1.48%) (Valores de normalidad del laboratorio 120-220 mg/dl).

Triglicéridos:

Test enzimático colorimétrico (Kit GPO-PAP) comercializado por Roche que utiliza suero y se realiza en el autoanalizador BH/Hitachi 917, utilizándose controles y calibradores de Roche. (CV.= 4.5%) (Valores de normalidad del laboratorio 50-170 mg/dl).

HDL-Colesterol:

El método directo utiliza dos tipos de reactivos R₁ y R₂, el reactivo R₁ está compuesto por sulfato de excidodextrina 0.5 mmol/l, sulfato de dextran 0.5 g/l y sulfato de magnesio 7mg/ml. El reactivo R₂ esta compuesto de PEG-colesteroxidasa, PEG-colesterolesterasa y 4-aminofenazona, estos reactivos están comercializados por los laboratorios Roche. La modificación de estas enzimas con PEG les confiere actividad catalítica específica frente al colesterol transportado por las HDL, mientras que la α -ciclodextrina sulfatada, en presencia de iones Mg²⁺, reduce esta actividad frente a las lipoproteínas con baja relación proteínas/lípidos.

La prueba se realiza en el autoanalizador BH/Hitachi 917 comercializado por Roche, utilizándose controles y calibradores de los laboratorios Roche.(CV = 4.5%) (Valores de normalidad del laboratorio 27-67 mg/dl).

VLDL-Colesterol:

Se obtiene por cálculo matemático a partir de los triglicéridos, dividiendo estos entre 5.(Valores de normalidad del laboratorio 12-34 mg/dl)

LDL-Colesterol:

Se calcula con la formula de Friedewald (Friedewald y col 1972):
LDL-Colesterol (mg/dl) = Colesterol total – (Triglicéridos/5 + HDL-Colesterol).

Apolipoproteína A:

Técnica por inmunoturbidimetría que utiliza anticuerpo APA (5 ml), anticuerpo de mamífero para APA humana que utiliza azida sódica al 0.1% como conservante. La prueba se realiza con suero en el autoanalizador Hitachi 911 comercializado por Roche, utilizándose reactivos, calibradores y controles de la casa Roche. (CV.= 7.5%) (Valores de normalidad del laboratorio 10-216 mg/dl).

Apolipoproteína B:

Técnica por inmunoturbidimetría que utiliza anticuerpo APA (5 ml), anticuerpo de mamífero para APA humana que utiliza azida sódica al 0.1% como conservante. La prueba se realiza con suero en el autoanalizador Hitachi 911 comercializado por Roche, utilizándose reactivos, calibradores y controles de la casa Roche. (CV.= 7.5%) (Valores de normalidad del laboratorio 60-133 mg/dl).

LP(a):

Técnica de inmunoturbidimetría que se realiza con suero en el autoanalizador Hitachi 911 comercializado por Roche y que utiliza reactivos, calibradores y controles también de Roche. (Valores de normalidad del laboratorio 2-200 mg/dl)

Parámetros proteicos

Proteínas séricas totales:

Método cinético de Biuret que se realiza en el autoanalizador BH/Hitachi 917, utilizándose controles y calibradores de Roche. (CV.= 7.5%) (Valores de normalidad del laboratorio 5-7.8 g/dl).

Parámetros nitrogenados no proteicos

Urea:

Método enzimático colorimétrico que se realiza en el autoanalizador BH/Hitachi 917, utilizándose controles y calibradores de Roche. (CV.= 4.5%) (Valores de normalidad del laboratorio 10-50mg/dl).

Ácido úrico:

Método enzimático colorimétrico que se realiza en el autoanalizador BH/Hitachi 917, utilizándose controles y calibradores de Roche. (CV.= 3.0%) (Valores de normalidad del laboratorio 4.4-7.6 mg/dl).

Creatinina:

Método enzimático colorimétrico que se realiza en el autoanalizador BH/Hitachi 917, utilizándose controles y calibradores de Roche. (CV.= 3.0%) (Valores de normalidad del laboratorio 0.9-1.3 mg/dl).

Parámetros glucídicos

Glucosa:

Método enzimático colorimétrico que se realiza en el autoanalizador BH/Hitachi 917, utilizándose controles y calibradores de Roche. (CV.= 3.0%) (Valores de normalidad del laboratorio 65-110 mg/dl).

Enzimas hepáticas

GOT

Método cinético enzimático que se realiza en el autoanalizador BH/Hitachi 917, utilizándose controles y calibradores de Roche. (CV.= 5.3.0%) (Valores de normalidad del laboratorio 0-32 U/l).

GPT:

Método cinético enzimático que se realiza en el autoanalizador BH/Hitachi 917, utilizándose controles y calibradores de Roche. (CV.= 5.3.0%) (Valores de normalidad del laboratorio 0-35 U/l).

γ GT:

Método cinético enzimático que se realiza en el autoanalizador BH/Hitachi 917, utilizándose controles y calibradores de Roche. (CV.= 5.3.0%) (Valores de normalidad del laboratorio 7-32 U/l).

ESTUDIO GENÉTICO

Con 500 μ L de sangre total anticoagulada con EDTA se realizó extracción de ADN mediante el Kit Qiagen, basado en el procedimiento descrito por Higuchi (1989) y posteriormente se estudio el polimorfismo de la C677T de la MTHFR mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior digestión y amplificación con la enzima de restricción Hinf-I (GE Healthcare) como fue descrito por Frosst et al (1995).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Mediante paquete estadístico SPSS 13.0 para Windows XP se realizó según los casos lo siguiente:

Análisis descriptivo univariante:

a) Parámetros de estadística básica: media, moda, mediana, desviación estándar, percentiles y rango (máximo y mínimo)

b) El test de contraste de hipótesis entendido como el grado de significación de las diferencias entre medias, globales y corregidas (en función de la edad, sexo, ingesta deficiente, adecuada o excesiva en relación con cada uno de los parámetros), se analizará mediante el test de la "t" de Student, test de Newman-Keuls previo análisis de la varianza. En caso de que la distribución sea no homogénea, se aplicarán pruebas estadísticas no paramétricas como el test de la U de Mann-Whitney o el de Kruskal-Wallis.

c) El nivel de asociación entre variables se estudiará mediante coeficiente de correlación de las relaciones entre datos con establecimiento de la ecuación de regresión.

Modelos lineales generales:

Se realizará el análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas basal (a), 5-MTHF (b), PGA (c). En los casos en que la distribución normal no pueda ser asegurada, se aplicarán pruebas estadísticas no paramétricas. Test de Wilcoxon comparando pares: [(a)-(b)], [(a)-(c)], [(b)-(c)].

MÉTODO BIBLIOGRAFICO

Para la obtención del material bibliográfico se utilizaron sistemas de búsquedas directas con el Índice Médico Español, Index Medicus y Excerpta Médica y búsqueda informatizada con el MEDLINE avanzado, con acceso a las bases de datos Pubmed, Infotrieve, BioMedNet, Medscape, Avicena, Healthgate, PhyNet y The National Library of Medicine.

VITAMINAS B Y HOMOCISTEÍNA

B-Vitamins and Homocysteine in Spanish institutionalized elderly

Ricardo Sola^{1,2}, Marcela Gonzalez-Gross^{2,3}, Ulrike Albers³, Laura Barrios⁴, Monika Alder^{3,5}, Manuel J Castillo², Klaus Pietrzik⁵

¹Servicio de Hematología. Hospital Clínico San Cecilio de Granada. Spain

²Grupo Effects 262. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. Spain

³Facultad de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte. Universidad Politécnica de Madrid. Spain.

⁴Centro Técnico de Informática. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Spain.

⁵Institut für Ernährungs-und Lebensmittelwissenschaften, Pathophysiologie der Ernährung, Rheinische Friedrichs-Wilhelms Universität Bonn, German

Address for correspondence:

Prof. Dr. Marcela Gonzalez-Gross

Facultad de CC de la Actividad Física y del Deporte Universidad Politécnica de Madrid

c/ Martín Fierro s/n E-28040 Madrid

Tel.: +34 91 336 4006 Fax: +34 91 5497307

e-mail: marcela.gonzalez.gross@upm.es

Key words: Folate - Vitamin B₁₂ - Holotranscobalamin II - Homocysteine - Elderly

*This study has been supported by the Spanish Ministry of Health Instituto de Salud Carlos III (FIS PI021830). Axis-Shield (Oslo, Norway) has kindly provided the Holo-TC RIA reagent kit. We want to thank Ms R Arcas, Ms P Carazo, Ms R Perez and Ms Verena Lemmen for their collaboration in this study.

Summary

Background:

Hyperhomocysteinemia is an accepted risk factor for cardiovascular disease, and possibly also for cognitive impairment and dementia. It has also been proposed as a marker of the status of the B vitamins, which are implicated in the metabolic circle. Therefore, especially in the elderly, it is important to know the prevalence of high homocysteine (tHcy) levels and the influence that B vitamins have on them.

Material and Methods:

Two-hundred and eighteen elderly of both sexes, aged 60-105, living in an elderly home in Granada (Spain), were screened for serum folate, red blood cell (RBC) folate, serum cobalamin (B₁₂) (Abbott, IMx), holotranscobalamin II (Holo-TC II) (HoloTC RIA, Axis-Shield), Methylmalonic Acid (MMA) (MS-GC), total pyridoxine (B₆) (HPLC), and tHcy (Abbott, IMx).

Results:

Hyperhomocysteinemia (tHcy >12 µmol/L) was detected in 80.7%. Serum folate deficiency was severe (≤ 4 ng/mL) in 19.3% and moderate (4 –7 ng/mL) in 43.1%. In 14.2% of the elderly RBC folate was ≤ 175 ng/mL, and in 61.0% it was between 175 – 400 ng/mL. Vitamin B₁₂, measured in serum (≤ 200 pg/mL), was deficient in 15.8%, but if measured as Holo-TC II (≤ 45 pmol/L), deficiency ranges up to 39.1%, MMA was high (≥ 300 nmol/L) in 45.6%. Vitamin B₆ (< 20 µg/L) was low in 78.9%. In order to identify the factors, that could predict tHcy levels, a multiple regression analysis was performed. Best results corresponded to the combination of log serum folate and log Holo-TC II which gives values of $R > 0.5$. If analysed independently, the highest correlation is with log serum folate ($r = -0.290$), followed by RBC folate ($r = -0.263$), Holo-TC II ($r = -0.228$), log B₁₂ ($r = -0.175$) and log B₆ ($r = -0.078$).

Conclusion:

There is a high prevalence of vitamin B deficiency and hyperhomocysteinemia in the studied population. Our data confirm the influence of these vitamins, especially folate, on tHcy levels, but hyperhomocysteinemia can not be used as the only diagnostic criterion to detect subclinical vitamin deficiency in elderly people, especially to detect vitamin B₁₂ and vitamin B₆ deficiency.

Introduction

Since the early sixties, several lines of evidence support the concept of elevated homocysteine concentrations in plasma being a risk factor for atherothrombotic diseases¹⁻⁵. In the same way, several studies and meta-analyses have found inverse associations between objective measures of cognitive function and plasma or serum homocysteine concentrations^{1,6-14}. These observations suggest that homocysteine can serve as a predictor of cognitive decline¹⁵. More recently, high serum homocysteine levels have been related to increased risk of hip fractures¹⁶, osteoporosis¹⁷, and pseudoexfoliative glaucoma¹⁸.

Serum total homocysteine (tHcy) is determined by a variety of hereditary and environmental factors. Vitamin deficiency of the B vitamins implicated in the methylation cycle is by far the most frequent cause of hyperhomocysteinemia as stated in a lot of cross-sectional studies^{15,20}. Data published recently have put under question the relevance of reducing tHcy levels in order to prevent cardiovascular events. Two studies found no relationship between homocysteine and cognitive function scores^{21,22}. But in spite of these results, which need further analysis and are out of scope of the current research, there is enough evidence in the literature about the relationship of high homocysteine levels and increased risk of the above-mentioned diseases. In the same sense, several studies support the evidence of considering tHcy in serum as a sensitive marker of folate and vitamin B₁₂ status in different population groups²³, including the elderly^{6,15,24,25}.

Hyperhomocysteinemia in the elderly is related in most of the studies to the coexistence of deficiency of one or more of the three B vitamins vitamin B₁₂, folate and vitamin B₆ which might be responsible for the severity and prevalence^{19,26,27}.

On the other hand, vitamin deficiency by itself has been related with increased risk of several diseases, which are more prevalent at older ages. Folate deficiency (for review, see²⁸) seems to be involved in cardiovascular risk²⁹ and cognitive impairment/dementia³⁰⁻³³ via other mechanisms not related to high tHcy levels. In the same way, vitamin B₁₂ deficiency has been related to impaired cognitive function³⁴ among others (for review, see Sola et al, in press³⁵).

Vitamin B₆ deficiency has been related to several diseases (for review, see Spinneker et al, in press³⁶), including loss of neurocognitive function⁶. The observation that vitamin B₆ by itself is inversely associated with CVD risk is supported by findings of others³⁷⁻³⁹. In several studies, a combination of vitamin deficiency has been observed, which aggravates the clinical signs⁴⁰.

Research during the last decade has shown a high prevalence of folate and vitamin B₁₂ deficiency in elderly people, in most of the developed countries in Europe⁴¹⁻⁴³, EEUU^{19,20}, Australia⁴⁴. Even vitamin B₆ has been considered a critical vitamin in the elderly⁴⁵⁻⁴⁷. Reasons for vitamin deficiency may range from poor food intake, malabsorption and drug intake. Some elderly suffer from disturbed resorption or stomach acid production or a deficiency of intrinsic factor which can be prevalent in 30%-40%⁴⁸. Changes in gastric physiology can also be induced by several drugs, which consequently impair vitamin metabolism⁴⁹. Elderly people are at risk because they often take different drugs. In Spain, it has been stated, that people aged > 65 take a mean of 3 different medications per day⁵⁰. For example, absorption of vitamin B₁₂ is predominately reduced by proton pump inhibitors such as omeprazole and lansoprazole⁵¹. Specifically at nutritional risk are institutionalized elderly⁵². Data on the determinants of homocysteine concentrations in elderly institutionalized Europeans are scarce⁵³.

Therefore, the objective of the present research was to investigate the prevalence of high tHcy and low vitamin status and the contribution of combined vitamin B deficiency to hyperhomocysteinemia in the elderly. In this report, we describe the distribution of serum total homocysteine concentrations among elderly institutionalized Spanish men and women. We examined the association of homocysteine concentration with serum concentrations of folate, vitamin B₁₂, holotranscobalamin II (Holo-TC II), methylmalonic acid (MMA), red blood cell (RBC) folate and total vitamin B₆. To the

best of our knowledge, this is one of the first studies to include Holo-TC II in the complete analysis.

Material and Methods

Study design

This study is part of a larger cross-sectional study that aims to establish the vitamin B status of Spanish institutionalized elderly, with special regard to vitamin B₁₂ and folate in association with homocysteine. It has been supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III of the Spanish Ministry of Health.

Subjects

Two-hundred and eighteen elderly (82 men and 136 women) aged > 60 years (mean age \pm SD was 76 ± 7 and 81 ± 9 for men and women, respectively) living in an elderly's home in Granada, Spain, were recruited for

the study. Anamnesis and blood sampling were included in the biannual medical review that is performed in all the elderly living in the residence. The residents who took part in the study were all elderly living at the residence. No exclusion criteria were applied. The medication of the elderly was no exclusion criterion because the reality about drug intake and micronutrient status should be documented, although that could affect the results of the study. The mean drug intake in Spanish elderly has been estimated recently to be 6 different medications per day. The study was approved by the Human Research Review Committee of the University of Granada, School of Medicine. The study has been performed following the ethic norms of the Declaration of Helsinki 1961 (revision of Edinburgh 2000), Convention of Oviedo (1997), the Good Clinical Practice of the CEE (document 2001/20/EC April 2001) and the Spanish legislation about clinical research in humans (Real Decreto 561/1993 sobre ensayos clínicos). Informed written consent was obtained from subjects or their relatives.

Blood sampling

After a 10-hours overnight fast, blood samples were drawn between 8:00 and 10:00 h in the morning. Following venipuncture, 3 mL of EDTA-treated blood was analysed within four hours for haematology, for RBC folate and for blood smears. Two 8 mL vacutainers with gel for serum were immediately put on ice and centrifuged within one hour at 2000 x g and 4°C for 10 min. Following centrifugation, they were aliquoted and immediately frozen at -80°C. One mL heparin-treated blood also was immediately frozen.

Analytical methods

Haematological and biochemical data were collected with the use of standard methods. Serum tHcy was analyzed by a totally automated fluorescence polarisation immunoassay (FPIA; IMx tHcy Kit, Abbot Diagnostic, Abbot Park, IL, USA). Serum folate, RBC folate, and serum cobalamin levels were measured by using the fluorometric method with an Abbot IMx autoanalyser (Abbot Laboratory, Chicago, USA). MMA was measured by gas chromatography and mass spectrometry. Holo-TC II levels were measured by a radioimmunoassay (HoloTC RIA) provided by Axis-Shield (Oslo, Norway). Axis-Shield has developed a simple and reliable assay method for measuring the active vitamin B₁₂ in blood, that is HoloTCII, based on the novel finding that HoloTCII constitutes the biologically functional vitamin B₁₂ fraction. Thus, measurement of this fraction is expected to afford superior diagnostic specificity and allows early identification of patients with vitamin B₁₂ deficiency. Vitamin B₆ was analysed by HPLC.

Statistical analyses

The Kolmogorov-Smirnov test indicated that none of the parameters was normal distributed. Therefore, parameters were natural log (ln) transformed. Unpaired comparisons were carried out with the two-sided t-test. For comparison of more than two unpaired means, one-way-ANOVA was applied. A stepwise multiple linear regression analysis was used to assess the dependency of tHcy on other measured variables. For the descriptive statistics, mean, standard deviation, median, and the range between the 5th and 95th percentile are shown. P values < 0.05 were considered to be statistically significant. Statistical

analyses were performed using the SPSS statistical software (version 12.0 for Windows XP; SPSS Inc, Chicago).

Results

Table 1 summarizes median serum concentrations of vitamins and related parameters in our study population separated by gender. Mean Holo-TC II, serum and RBC folate and total vitamin B₆ levels were higher in women, the differences not being significant. Therefore, further data analysis has not been performed by gender.

Figure 1 illustrates the percentage of cases below or above the used cut-offs points which indicate abnormal values for all measured parameters⁵⁴⁻⁵⁸. Almost half of the study population had serum folate concentrations below the cut-off for moderate deficiency (< 6 ng/mL). According to RBC folate concentrations, 14% had a deficient folate status (< 175 ng/mL). Seventeen point one percent possessed serum cobalamin concentrations lower than 200 pg/mL. HoloTCII concentrations were suboptimal (< 45 pmol/L) in 37% of our study population. The percentage of people showing a MMA concentration above 300 nmol/L amounted actually 45%. Hyperhomocysteinemia (tHcy ≥ 15 μmol/L) was present in more than half of the study population and the total vitamin B₆ concentration was deficient in nearly 80% of the subjects (< 20 mg/L).

Mean homocysteine concentration by vitamin status

Figure 2 (graphs and tables) shows homocysteine concentrations in the quartiles of serum and RBC folate and results of the one way ANOVA with ln transformed tHcy. Mean serum tHcy concentrations for subjects in the lowest quartile of serum folate was 19.2 μmol/L, this value is significantly higher ($P < 0.05$) than the mean for subjects in the 3rd ($P < 0.05$) and 4th quartile ($P < 0.001$), which were 15.3 and 13.7 μmol/L, respectively. Mean serum tHcy concentration for subjects in the first quartile of RBC folate was 18.6 μmol/L and therefore significantly different from the mean for subjects in the highest quartile which was 14.1 μmol/L ($P = 0.001$).

Figure 3 shows statistics and ANOVA results of tHcy concentrations in the quartiles of vitamin B₁₂, Holo-TCII and vitamin B₆.

There were no significant differences between the mean homocysteine concentrations of the four quartiles of both serum cobalamin and HoloTCII and vitamin B₆.

In Tables 2 and 3, levels of vitamin-related parameter are shown using two different cut-offs of hyperhomocysteinemia (12 and 15 $\mu\text{mol/L}$, respectively). In Table 2, using the cut-off of \leq and $>$ 12 $\mu\text{mol/L}$, mean levels are statistically different for all parameters exception made for MMA and vitamin B₆. In Table 3, using the cut-off of \leq and $>$ 15 $\mu\text{mol/L}$, mean levels are statistically different for all parameters exception made for SCbl and vitamin B₆.

In the stepwise multiple linear regression analysis, all the vitamin-related parameters were included in order to determine the predictors of tHcy. Serum folate was the most powerful independent predictor followed by Holo-TC II (Table 4). These factors together explained 26% of the variation of tHcy. If MMA is added to the model, the percentage of the variation of tHcy explained by them amounts 27%. If tHcy values $>$ 30 $\mu\text{mol/L}$ were excluded from the model, MMA also dropped out as a predictor of tHcy levels.

Discussion

The results of the present study indicate that low folate, vitamin B₁₂ (serum cobalamin and Holo-TC II) and vitamin B₆ status and elevated tHcy and MMA concentrations are highly prevalent among Spanish institutionalized elderly. Our results confirm data published in the literature about the prevalence of low B vitamin levels in older populations^{44,45}.

Studies of homocysteine and vascular disease would suggest that a substantial proportion of our elderly population may be at elevated risk of vascular disease due to hyperhomocysteinemia¹⁻⁵. Fifty-five percent of our study population had tHcy concentrations above 15 $\mu\text{mol/L}$ and 82% had tHcy concentrations above 12 $\mu\text{mol/L}$, which already is considered a concentration with elevated risk for atherothrombotic diseases⁵⁹. Selhub et al¹⁹ found that approximately 29% of their population had tHcy concentrations higher than 14.0 $\mu\text{mol/L}$ and 19% higher than 16.4 $\mu\text{mol/L}$. Fifty point twenty-three percent

of our study population had homocysteine levels above 15.8 $\mu\text{mol/L}$, the level that Stampfer et al⁶⁰ related to a more than threefold elevation in risk of myocardial infarction.

Saw et al⁶¹ found that there was a $\approx 1 \mu\text{mol/L}$ increase, on average, in homocysteine concentration per decade increase in age between 45 and 74 y in Chinese men and women in Singapore. Therefore, it is not surprising that we found high mean homocysteine concentrations in our population. Nevertheless, a comparison of our data with values measured in different elderly populations' shows that mean tHcy concentrations were higher in our group than in most of the previously reported study groups. Mean concentration in these studies ranged from 9.1 $\mu\text{mol/L}$ in a group of Chinese women aged 45–74 y⁶¹ to 12.4 $\mu\text{mol/L}$ in a group of 130 independently living elderly people over the age of 65 y⁶². Other authors report tHcy concentrations of 12.0 $\mu\text{mol/L}$ in a population with a mean age of 73.8 y⁶³; in a subset of the Framingham offspring cohort aged 67 to 96 years, median tHcy concentration was 11.6 $\mu\text{mol/L}$ and was higher in men than in women, which disappeared after adjustment for plasma vitamin concentrations¹⁹. In a subset of the Framingham offspring cohort with people aged 65 and older who were examined again 7 years later, mean tHcy concentration was 10.6 $\mu\text{mol/L}$ which was 23% higher than in persons aged < 45 years and was higher in men than in women⁶⁴. Koehler et al²⁴ studied a population of persons aged 65 and older, and found a mean tHcy concentration of 10.29 $\mu\text{mol/L}$ among non-B-vitamin-supplement users (mean age 76.1 y). In Taiwanese elderly, the overall prevalence of hyperhomocysteinemia (tHcy > 15 $\mu\text{mol/L}$) was 23.4% for elderly males and 11.2% for elderly females⁶⁵.

A possible explanation is the fact, that we studied institutionalized elderly, which are at greater risk for vitamin deficiencies and thus for high homocysteine values than free-living elderly. In a subset of participants of the British National Diet and Nutrition Survey of people aged 65 and over, Bates et al⁵² report a much higher mean tHcy concentration in institutionalized participants than in free-living subjects, 18.3 $\mu\text{mol/L}$ and 14.7 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

As stated before, moderately increased tHcy and low B vitamin concentrations may cause cardiovascular disease, neuropsychiatric damage, or hematologic abnormalities^{1,66-69}. Meta-analyses suggested

that a reduction of 1 $\mu\text{mol/L}$ tHcy can result in a 10 % reduction in risk of coronary artery disease.

This prognosis was based on tHcy concentrations within the range of 10-15 $\mu\text{mol/L}$ ¹. Total Hcy values in our population exceeded this range, and the question remains whether this prediction is valid for such an old population.

Data are needed on the implication of a 10 % reduction in old age. Recent published data from the Veterans Affairs Normative Aging Study suggest that low B vitamin and high homocysteine concentrations predict cognitive decline in a 3-year follow-up⁷⁰.

Since there is still no consensus definition of hyperhomocysteinemia, and we did not have a group of healthy adult control subjects to define our own cut-off, for analysing our data we used two cut-offs which have been used in previous studies^{2,71}, that is, 12 and 15 $\mu\text{mol/L}$. It has been stated that plasma tHcy levels between 12 $\mu\text{mol/L}$ and 16 $\mu\text{mol/L}$ may be referred to as mild hyperhomocysteinemia⁷². The problem with the cut-offs for tHcy and B vitamins has been reported previously by other authors^{45,73} and is part of our current research. In the meanwhile, we have used some of the most frequently used cut-offs in the literature. When comparing the results of the analysed parameter by the two cut-offs trials (Tables 2 and 3), we observed that for SCbl there is a change from one situation to the other, because the differences are not clearly defined by this parameter. For MMA the situation is the same, because when changing the cut-off the evidence of significance is not clear. This means that both SCbl and MMA are not stable in the cut-off borderlines. On the contrary, Holo-TC II, serum folate and RBC folate present very clear differences in the two cut-off trials. These differences are clearer when using 12 $\mu\text{mol/L}$ as cut-off. Vitamin B₆ does not change in the two processes. It is also interesting to point out that in the interval between 12 and 15 $\mu\text{mol/L}$ there are a lot of individuals. The "n" changes from 42 subjects to 99 in the ≤ 12 and ≤ 15 $\mu\text{mol/L}$ groups, respectively. If the data are analysed the inverse way, measuring tHcy levels in the quartiles of the parameters instead of cut-offs (Fig. 2 and 3), the previously established relationships are confirmed for both RBC and serum folate. For Holo-TC II it is not so clear. It seems that this variable behaves better with an established cut-off. All in all, there is no doubt about the high

prevalence of abnormal levels of vitamin-related parameters and the variation with other reference values would be very small.

In a stepwise linear regression model, only serum folate, Holo-TC II, and MMA remained in the model as significant predictors of tHcy. Serum levels of these three parameters account for 27% of the variation in tHcy. Strongest predictor was serum folate. This is in line with previous findings that folate plays the most important role in homocysteine metabolism^{24,74,75}. In a study of the Framingham offspring cohort⁶⁴, concentrations of folate were identified as primary determinants of homocysteine. Studies performed in Europe confirm these findings^{62,76}. We found no significant correlation between vitamin B₆ and tHcy levels, confirming data from other studies⁴⁵. Our results confirm the importance of the influence of serum folate and introduces Holo-TC II on the changes produced on tHcy levels, in this case, with no previous hypothesis of cut-off. Although the levels obtained for R² are not enough to justify a predictive model (Table 4).

Prevalence of B vitamin deficiency

The vitamin B₁₂ status in our study population is comparable to findings of different studies. Mean serum B₁₂ concentrations scatter around 250 pmol/L in most studies and are higher in women than in men, though not always significant^{19,24,56,63,77}. Very low vitamin B₁₂ values are reported by Bates et al⁵² in both free-living and institutionalized elderly.

In Europe, folate deficiency is the most common vitamin deficiency. A population especially at risk are institutionalized elderly. We found a very high prevalence of marginal folate deficiency 48% (< 6 ng/mL) and 7% with serum folate levels below 3 ng/mL. According to the long-term parameter RBC folate, 14% of our population are at risk for folate deficiency. Considering tHcy a more sensitive indicator of folate deficiency, there could be an even higher prevalence of tissue deficiency of folate. We found elevated tHcy concentrations in 82% of our population, indicating an overall inadequate B-vitamin status.

Measurement of the metabolite, which accumulates when vitamin B₁₂-, folate-, and vitamin B₆-dependent enzymatic reactions are impaired, should provide a better indication of intracellular deficiency of these vitamins. Joosten et al⁷⁸ measured serum concentrations of

these vitamins and four metabolites, including tHcy, in 99 healthy young people, 64 healthy elderly subjects, and 286 elderly hospitalized patients. A low serum vitamin B₁₂ concentration was found in 6% and 5%, low folate in 5% and 19%, and low vitamin B₆ in 9% and 51%, and one or more metabolites were elevated in 63% and 83% of healthy elderly subjects and elderly hospitalized patients, respectively. These results strongly suggest that the prevalence of tissue deficiencies of vitamin B₁₂, folate, and vitamin B₆ as demonstrated by the elevated metabolite concentrations is substantially higher than that estimated by measuring concentrations of the vitamins. This may be true in our population as well. Clarke et al⁵⁶ reported that among persons aged 65-74 and ≥ 75 years, ≈ 10% and 20%, respectively, were at high risk of folate deficiency. Overall, ≈ 10% of the younger age group with low folate also had low B₁₂ concentrations (< 150 pmol/L). Mean serum folate levels in our study population are comparable to those observed in other studies among elderly. Reported values for folate range around 14-25 nmol/L^{24,56,64}. Very low mean serum folate levels are reported by Henning et al⁶³ who investigated a group of German elderly (mean 5.5 nmol/L).

Discrepancies between the percentages of inadequate vitamin status in function of which parameter is used are shown in Figure 1. Vitamin B₁₂ deficiency ranges from 17.13% if serum cobalamin is measured, 37.4% if Holo-TC II is measured, and up to 44.9% if MMA is considered. Several authors have stated that the clinical severity of vitamin B₁₂ deficiency is unrelated to vitamin B₁₂ concentrations, reflecting the limitations of standard vitamin B₁₂ assays^{79,80}.

Functional deficiency may occur even in people whose serum vitamin B₁₂ concentrations are in the normal (i.e. reference) range⁷⁸. Folate deficiency also causes macrocytic anemia but may have neurologic features that differ from those of vitamin B₁₂ deficiency. Accurate identification of vitamin B₁₂ deficiency is important because inappropriate treatment with folic acid will correct the haematological signs of vitamin B₁₂ deficiency but leave the neurological symptoms unaltered⁸¹. Several studies indicate that serum vitamin B₁₂ is not a reliable indicator of vitamin B₁₂ deficiency. Therefore, we measured not only serum cobalamin but also a more sensitive parameter to detect B₁₂ deficiency: Holo-TC II^{58,82-84}. We found a significant correlation ($r=0.656$; $p \leq 0.01$) between Holo-TC II and serum B₁₂. Serum cobalamin as a classical marker for vitamin B₁₂ deficiency may lead to an

underestimation of the problem. Functional markers like Holo-TC II might be more useful for early detection of vitamin B₁₂ deficiency. The observations of the present study, when combined with those of van Asselt⁸⁵, Bjorkegren and Svardsudd⁷⁶, and Bates⁵² suggest that older people living in Europe may be at risk for functional vitamin B₁₂ deficiency.

In summary, there is a high prevalence of vitamin B deficiency and hyperhomocysteinemia in the studied population. Routine screening of older persons for vitamin B₁₂, folate and vitamin B₆ deficiency may be indicated. Our data confirm the influence of these vitamins, especially folate, on tHcy levels, but elevated tHcy can not be used as the only diagnostic criterion to detect subclinical vitamin deficiency in elderly people. Folates and Holo TC II are the best predictors of tHcy levels. But data analysis suggests that these parameters taken separately are not completely predictive of tHcy levels.

References:

- 1.- Boushey, C.J., Beresford, S.A.A., Omenn, G.S. and Motulsky, A.G. (1995) A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*. 274, 1049-1057.
- 2.- Graham, I.M., Daly, L.E., Refsum, H.M., Robinson, K., Brattstrom, L.E., Ueland, P.M., Palma-Reis, R.J., Boers, G.H., Sheahan, R.G., Israelsson, B., Uiterwaal, C.S., Meleady, R., McMaster, D., Verhoef, P., Witteman, J., Rubba, P., Bellet, H., Wautrecht, J.C., de Valk, H.W., Sales Luis, A.C., Parrot-Rouland, F.M., Tan, K.S., Higgins, I., Garcon, D., Andria, G. and et al. (1997) Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. European Concerted Action Project. *JAMA*. 277, 1775-1781.
- 3.- Nygard, O., Nordrehaug, J.E., Refsum, H., Ueland, P.M., Farstad, M. and Vollset, S.E. (1997) Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med* 337, 230-236.
- 4.- Refsum, M., H., Ueland, M., P. M., Nygard, M., O. and Vollset, S. E. (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu. Rev. Med.* 49, 31-62.
- 5.- Wald, N.J., Watt, H.C., Law, M.R., Weir, D.G., McPartlin, J. and Scott, J.M. (1998) Homocysteine and ischemic heart disease: Results of a prospective study with implications regarding prevention *Arch. Intern. Med.* 158, 862-867.
- 6.- Riggs, K., Spiro, A., 3rd, Tucker, K. and Rush, D. (1996) Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 306-314.
- 7.- Miller, J.W. (1999) Homocysteine and Alzheimer's disease. *Nutr. Rev.* 57,126-129.
- 8.- Lehmann, M., Gottfries, C.G. and Regland, B. (1999) Identification of cognitive impairment in the elderly: homocysteine is an early marker. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 10, 12-20.
- 9.- McCaddon, A., Davies, G., Hudson, P., Tandy, S. and Cattell, H. (1998) Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 13, 235-239.

- 10.-Bell, I.R., Edman, J.S., Morrow, F.D., Marby, D.W., Mirages, S., Perrone, G., Kayne, H.L. and Cole, J.O. (1991) B complex vitamin patterns in geriatric and young adult inpatients with major depression. *J. Am. Geriatr. Soc.* 39, 252-257.
- 11.-Budge, M., Johnston, C., Hogervorst, E., de Jager, C., Milwain, E., Iversen, S.D., Barnetson, L., King, E. and Smith, A.D. (2000) Plasma total homocysteine and cognitive performance in a volunteer elderly population. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 903, 407-410.
- 12.-Nilsson, K., Gustafson, L. and Hultberg, B. (2000) The plasma homocysteine concentration is better than that of serum methylmalonic acid as a marker for sociopsychological performance in a psychogeriatric population. *Clin. Chem.* 46, 691-696.
- 13.-Morris, M.S., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H. and Selhub, J. (2001) Hyperhomocysteinemia associated with poor recall in the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 927-933.
- 14.-Jensen, E., Dehlin, O., Erfurth, E.-M., Hagberg, B., Samuelsson, G., Svensson, T. and Hultberg, B. (1998) Plasma homocysteine in 80-year-olds: Relationships to medical, psychological and social variables. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 26, 215-226.
- 15.-Gonzalez-Gross, M., Marcos, A. and Pietrzik, K. (2001) Nutrition and cognitive impairment in the elderly. *Br. J. Nutr.* 86, 313-321.
- 16.-McLean, R.R., Jacques, P.F., Selhub, J., Tucker, K.L., Samelson, E.J., Broe, K.E., Hannan, M.T., Cupples, L.A. and Kiel, D.P. (2004) Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N. Engl. J. Med.* 350, 2042-2049.
- 17.-Herrmann, M., Widmann, T. and Herrmann, W. (2005) Homocysteine — a newly recognised risk factor for osteoporosis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43, 1111-1117.
- 18.-Cumurcu, T., Sahin, S. and Aydin, E. (2006) Serum homocysteine, vitamin B 12 and folic acid levels in different types of glaucoma. *B.M.C. Ophthalmol.* 6, 6.
- 19.-Selhub, J., Jacques, P.F., Wilson, P.W.F., Rush, D. and Rosenberg, I.H. (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA.* 270, 2693-2698.

- 20.-Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., Rogers, G., Bowman, B.A., Gunter, E.W., Wright, J.D. and Johnson, C.L. (1999) Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. *Ann. Intern. Med.* 131, 331-339.
- 21.-Kalmijn, S., Launer, L.J., Lindemans, J., Bots, M.L., Hofman, A. and Breteler, M.M. (1999) Total homocysteine and cognitive decline in a community-based sample of elderly subjects: the Rotterdam Study. *Am. J. Epidemiol.* 150, 283-289.
- 22.-Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Zanardi, V., Dalmonte, E., Grossi, G., Cucinotta, D., Macini, P. And Caldarera, M. (2000) Blood homocysteine and vitamin B levels are not associated with cognitive skills in healthy normally ageing subjects. *J. Nutr. Health. Aging.* 4, 218-222.
- 23.-Vrentzos, G.E., Papadakis, J.A., Malliaraki, N., Bampalis, D.E., Repa, A., Lemonomichelaki, V., Petinellis, E.G. and Ganotakis, E.S. (2006) Serum homocysteine concentration as a marker of nutritional status of healthy subjects in Crete, Greece. *J. Hum. Nutr. Diet.* 19, 117-123.
- 24.-Koehler, K.M., Baumgartner, R.N., Garry, P.J., Allen, R.H., Stabler, S.P. and Rimm, E.B. (2001) Association of folate intake and serum homocysteine in elderly persons according to vitamin supplementation and alcohol use. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 628-637.
- 25.-Carmel, R., Green, R., Rosenblatt, D.S. and Watkins, D. (2003) Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematol. (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*, 62-81.
- 26.-Jacques, P.F., Selhub, J., Bostom, A.G., Wilson, P.W.F. and Rosenberg, I.H. (1999) The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations *N. Engl. J. Med.* 340, 1449-1454.
- 27.-Selhub, J. (2006) The many facets of hyperhomocysteinemia: studies from the Framingham cohorts. *J. Nutr.* 136, 1726S-1730S.
- 28.-Gonzalez-Gross, M., Prinz-Langenohl, R. and Pietrzik, K. (2002) Folate status in Germany 1997-2000. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 72, 351-359.

- 29.-Morrison, H.I., Schaubel, D., Desmeules, M. and Wigle, D.T. (1996) Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. *JAMA*. 275, 1893-1896.
- 30.-Snowdon, D.A., Tully, C.L., Smith, C.D., Riley, K.P. and Markesbery, W.R. (2000) Serum folate and the severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun study. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 993-998.
- 31.-Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W.F. and Wolf, P.A. (2002) Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease *N. Engl. J. Med.* 346, 476-483.
- 32.-Ramos, M.I., Allen, L.H., Mungas, D.M., Jagust, W.J., Haan, M.N., Green, R. and Miller, J.W. (2005) Low folate status is associated with impaired cognitive function and dementia in the Sacramento Area Latino Study on Aging. *Am. J. Clin. Nutr.* 82, 1346-1352.
- 33.-Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Martelli, M., Servadei, L., Brunetti, N., Porcellini, E. And Licastro, F. (2005) Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 82, 636-643.
- 34.-McCaddon, A. and Kelly, C.L. (1994) Familial Alzheimer's disease and vitamin B12 deficiency. *Age Ageing*. 23, 334-337.
- 35.-Sola, R., Gonzalez-Gross, M., Pietrzik, K. and Castillo, M.J. (In press) ¿Existe la necesidad de una detección precoz del déficit de vitamina B12? *Nutr. Hosp.*
- 36.-Spinneker, A., Sola, R., Lemmen, V., Gonzalez-Gross, M., Castillo, M.J. and Pietrzik, K. (In press) Vitamin B6 status, deficiency and its consequences – an overview.
- 37.-Folsom, A.R., Nieto, F.J., McGovern, P.G., Tsai, M.Y., Malinow, M.R., Eckfeldt, J.H., Hess, D.L. and Davis, C.E. (1998) Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation*. 98, 204-210.

- 38.-Robinson, K., Mayer, E.L., Miller, D.P., Green, R., van Lente, F., Gupta, A., Kottke-Marchant, K., Savon, S.R., Selhub, J., Nissen, S.E. and et al. (1995) Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation*. 92, 2825-2830.
- 39.-Friso, S., Jacques, P.F., Wilson, P.W., Rosenberg, I.H. and Selhub, J. (2001) Low circulating vitamin B(6) is associated with elevation of the inflammation marker C-reactive protein independently of plasma homocysteine levels. *Circulation*. 103, 2788-2791.
- 40.-Paulionis, L., Kane, S.L. and Meckling, K.A. (2005) Vitamin status and cognitive function in a long-term care population. *B.M.C. Geriatr*. 5, 16.
- 41.-Serra-Majem, L., Ribas Barba, L., Armas Navarro, A., Alvarez Leon, E. and Sierra, A. (2000) Ingesta de energía y nutrientes y riesgo de ingesta inadecuada en las Islas Canarias (1997-98). *Arch. Latinoam. Nutr*. 50, 7-22.
- 42.-Christodoulakos, G., Panoulis, C., Rizos, D., Moustakarias, T., Phocas, I. and Creatsas, G. (2001) Homocysteine and folate levels in postmenopausal women. *Maturitas* 39, 161-167.
- 43.-van Wayenburg, C.A., van de Laar, F.A., de Waal, M.W., Okkes, I.M., van den Akker, M., van der Veen, W.J., Schellevis, F.G., van Staveren, W.A., van Binsbergen, J.J. and van Weel, C. (2005) Nutritional deficiency in Dutch primary care: Data from general practice research and registration networks. *Eur. J. Clin. Nutr*. 59 Suppl. 1, 187-194.
- 44.-Flood, V.M., Smith, W.T., Webb, K.L., Rohtchina, E., Anderson, V.E. and Mitchell, P. (2006) Prevalence of low serum folate and vitamin B12 in an older Australian population. *Aust. N. Z. J. Public Health*. 30, 38-41.
- 45.-Wolters, M., Hermann, S. and Hahn, A. (2003) B vitamin status and concentrations of homocysteine and methylmalonic acid in elderly German women. *Am. J. Clin. Nutr*. 78, 765-772.

- 46.-Bates, C.J., Pentieva, K.D., Prentice, A., Mansoor, M.A. and Finch, S. (1999) Plasma pyridoxal phosphate and pyridoxic acid and their relationship to plasma homocysteine in a representative sample of British men and women aged 65 years and over. *Brit. J. Nutr.* 81, 191-201.
- 47.-van den Berg, H. (1999) Vitamin B6 status and requirements in older adults. *Brit. J. Nutr.* 81, 175-176.
- 48.-Herbert, V. (1998) The elderly need oral vitamin B-12. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 739-740.
- 49.-Schumann, K. (1999) Interactions between drugs and vitamins at advanced age. *Int. J. Ital. Nutr. Res.* 69, 173-178.
- 50.-Arjona Mateos, C.R., Criado Velasco, J. and Sánchez Solís, L. (2002). Enfermedades crónicas y consumo de fármacos en mayores de 65 años. *Med. Gen.* 47, 684-695.
- 51.-Bradford, G.S. and Taylor, C.T. (1999) Omeprazole and vitamin B12 deficiency. *Ann. Pharmacother.* 33, 641-643.
- 52.-Bates, C.J., Schneede, J., Mishra, G., Prentice, A. and Mansoor, M.A. (2003). Relationship between methylmalonic acid, homocysteine, vitamin B12 intake and status and socio-economic indices, in a subset of participants in the British National Diet and Nutrition Survey of people aged 65 y and over. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 349-357.
- 53.-Refsum, H., Smith, A.D., Ueland, P.M., Nexø, E., Clarke, R., McPartlin, J., Johnston, C., Engbaek, F., Schneede, J., McPartlin, C. and Scott, J.M. (2004) Facts and recommendations about total homocysteine determinations: An expert opinion. *Clin. Chem.* 50, 3-32.
- 54.-Roe, D.A. (1986) Nutritional assessment of the elderly. *World. Rev. Nutr. Diet.* 48, 85-113.
- 55.-Keller, H.E. and Salkeld, R.M. (1988) Bereichswerte von Analysenparametern fuer den Vitaminstatus. *G.C.R. B.* 106, 334.
- 56.-Clarke, R., Refsum, H., Birks, J., Evans, J.G., Johnston, C., Sherliker, P., Ueland, P.M., Schneede, J., McPartlin, J., Nexø, E. and Scott, J.M. (2003) Screening for vitamin B-12 and folate deficiency in older persons. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1241-1247.

- 57.-Herbert, V. (1994) Staging vitamin B-12 (cobalamin) status in vegetarians. *Am. J. Clin. Nutr.* 59, 1213S-1222.
- 58.-Wickramasinghe, S.N. and Fida, S. (1993) Correlations between holo-transcobalamin II, holo-haptocorrin, and total B12 in serum samples from healthy subjects and patients. *J. Clin. Pathol.* 46, 537-539.
- 59.-Stanger, O., Herrmann, W., Pietrzik, K., Fowler, B., Geisel, J., Dierkes, J. and Weger, M. (2003) DACH-LIGA homocystein (german, italian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 1392-1403.
- 60.-Stampfer, M.J., Malinow, M.R., Willett, W.C., Newcomer, L.M., Upson, B., Ullmann, D., Tishler, P.V. and Hennekens, C.H. (1992) A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA.* 268, 877-881.
- 61.-Saw, S.M., Yuan, J.M., Ong, C.N., Arakawa, K., Lee, H.P., Coetzee, G.A. and Yu, M.C. (2001) Genetic, dietary, and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-aged and older Chinese men and women in Singapore. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 232-239.
- 62.-Ortega, R.M., Jimenez, A., Andres, P., Faci, M., Lolo, J.M., Lozano, M.C., Bermejo, L.M., Lopez-Sobaler, A.M. and Requejo, A.M. (2002) Homocysteine levels in elderly Spanish people: influence of pyridoxine, vitamin B12 and folic acid intakes. *J. Nutr. Health. Aging.* 6, 69-71.
- 63.-Henning, B.F., Tepel, M., Riezler, R. and Naurath, H.J. (2001) Long-term effects of vitamin B(12), folate, and vitamin B(6) supplements in elderly people with normal serum vitamin B(12) concentrations. *Geront.* 47, 30-35.
- 64.-Jacques, P.F., Bostom, A.G., Wilson, P.W., Rich, S., Rosenberg, I.H. and Selhub, J. (2001) Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 613-621.

- 65.-Chen, K.J., Pan, W.H., Yang, F.L., Wei, I.L., Shaw, N.S. and Lin, B.F. (2005) Association of B vitamins status and homocysteine levels in elderly Taiwanese. *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* 14, 250-255.
- 66.-Lindenbaum, J., Rosenberg, I., Wilson, P., Stabler, S. and Allen, R. (1994) Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *Am. J. Clin. Nutr.* 60, 2-11.
- 67.-Clarke, R. and Collins, R. (1998) Can dietary supplements with folic acid or vitamin B6 reduce cardiovascular risk? Design of clinical trials to test the homocysteine hypothesis of vascular disease. *J. Cardio. Risk.* 5, 249-255.
- 68.-Arnesen, E., Refsum, H., Bonna, K.H., Ueland, P.M., Forde, O.H. and Nordrehaug, J.E. (1995) Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int. J. Epidemiol.* 24, 704-709.
- 69.-Homocysteine Studies Collaboration (2002) Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: A meta-analysis *JAMA.* 288, 2015-2022.
- 70.-Tucker, K.L., Qiao, N., Scott, T., Rosenberg, I. and Spiro, A., 3rd (2005) High homocysteine and low B vitamins predict cognitive decline in aging men: the Veterans Affairs Normative Aging Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 82, 627-635.
- 71.-Guttormsen, A.B., Schneede, J., Ueland, P.M. and Refsum, H. (1996) Kinetics of total plasma homocysteine in subjects with hyperhomocysteinemia due to folate or cobalamin deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 194-202.
- 72.-Pietrzik, K. and Bronstrup, A. (1997) Causes and consequences of hyperhomocyst(e)inemia. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 67, 389-395.
- 73.-Baik, H.W. and Russell, R.M. (1999) Vitamin B12 deficiency in the elderly. *Ann. Rev. Nutr.* 19, 357-377.
- 74.-Tawakol, A., Omland, T., Gerhard, M., Wu, J.T. and Creager, M.A. (1997) Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation.* 95, 1119-1121.
- 75.-Selhub, J., Bagley, L.C., Miller, J. and Rosenberg, I.H. (2000) B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 614S-620S.

- 76.-Bjorkegren, K. and Svardsudd, K. (2001) Serum cobalamin, folate, methylmalonic acid and total homocysteine as vitamin B12 and folate tissue deficiency markers amongst elderly Swedes – a population-based study. *J. Intern. Med.* 249, 423-432.
- 77.-Bronstrup, A., Hages, M. and Pietrzik, K. (1999) Lowering of homocysteine concentrations in elderly men and women. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 69, 187-193.
- 78.-Joosten, E., van den Berg, A., Riezler, R., Naurath, H., Lindenbaum, J., Stabler, S. and Allen, R. (1993) Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B-12 (cobalamin), folate, and vitamin B-6 occur commonly in elderly people. *Am. J. Clin. Nutr.* 58, 468-476.
- 79.-Stabler, S.P. (2000) B12 and nutrition. In: *Biochemistry and biochemistry of B12* (Banerjee, R., ed.) pp. 343-365, John Wiley and Sons, New York.
- 80.-Carmel, R. (2000) Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu. Rev. Med.* 51, 357-375.
- 81.-Lindenbaum, J. and Allen, R.H. (1995) Clinical spectrum and diagnosis of folate deficiency. In: *Folate in health and disease* (Bailey, L.B., ed.) pp. 43-73, Marcel Dekker, New York.
- 82.-Nexo, E., Christensen, A.-L., Hvas, A.-M., Petersen, T.E. and Fedosov, S.N. (2002) Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. *Clin. Chem.* 48, 561-562.
- 83.-Herzlich, B. and Herbert, V. (1988) Depletion of Serum Holotranscobalamin-II – an early sign of negative vitamin-B12 balance. *Lab. Invest.* 58, 332-337.
- 84.-Lindenbaum, J., Savage, D.G., Stabler, S.P. and Allen, R.H. (1990) Diagnosis of cobalamin deficiency: II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *Am. J. Hematol.* 34, 99-107.
- 85.-van Asselt, D.Z., de Groot, L.C., van Staveren, W.A., Blom, H.J., Wevers, R.A., Biemond, I. and Hoefnagels, W.H. (1998) Role of cobalamin intake and atrophic gastritis in mild cobalamin deficiency in older Dutch subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 328-334.

DIAGNÓSTICO PRECOZ DE LA DEFICIENCIA DE B₁₂

Diagnostic scheme for the early diagnosis of vitamin B₁₂ deficiency in elderly people.

Sola R(1,2) González-Gross M(1,3,4), Barrios L(5), Pietrzik K(4), Castillo MJ(1).

(1) *Grupo EFFECTS 262. Dpto. Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Spain.*

(2) *Servicio de Hematología. Hospital Clínico Universitario San Cecilio, Granada. Spain.*

(3) *Facultad de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte. Universidad Politécnica de Madrid. Spain.*

(4) *Institut für Ernährungs-und Lebensmittelwissenschaften. Pathophysiologie. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität. Bonn. Germany.*

(5) *Centro Técnico de Informática. CSIC. Spain.*

✉ital for correspondence:

Prof. Dr. Marcela Gonzalez-Gross

Facultad de CC de la Actividad Física y del Deporte. Universidad Politécnica de Madrid. c/ Martín Fierro s/nE-28040 Madrid

Tel.: +34 91 336 4006 Fax: +34 91 5497307

e-mail: marcela.gonzalez.gross@upm.es

*Project granted by the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III (FIS PI021830). Axis-Shield (Oslo, Norway) has kindly provided the Holo-TC RIA reagent kit. We want to thank Ms R Arcas, Ms P Carazo, Ms R Perez and Dr Edward Valente for their collaboration in this study.

Summary:

Background: The elderly population is particularly at risk for developing vitamin B₁₂-deficiency. Sensitive methods for early detection of vitamin B₁₂-deficiency are not common in the routine laboratory. Normal serum cobalamin (SCbl) does not necessarily reflect a normal B₁₂ status. The determination of methyl malonic acid (MMA) is very expensive and not routinely possible. Holotranscobalamin II (Holo-TC), the fraction of functional vitamin B₁₂, has been proposed as a more sensitive B₁₂ status indicator. The aim of the present study is to establish a diagnostic scheme (DiagS) which includes these variables taking into account both clinical and economical criteria.

Material and Methods: Two-hundred and eighteen elderly of both sexes, aged 60-105, living in an Elderly Home in Granada (Spain), were screened for SCbl (Abbott, Imx), Holo-TC (HoloTC RIA, Axis-Shield, MMA (MS-GC), serum folate, red blood cell (RBC) folate, and tHcy (Abbott, Imx), which were the variables chosen based on clinical criteria. Several segmentation algorithms were drawn and analysed using SPSS 13.0 for Windows.

Results: From the initially four decision trees, two were analysed further after comparing the diagnosis with the clinical diagnosis made by the physician (haematologist). SCbl and tHcy were completely excluded from the model. DiagS 3 identified 19.05% isolated B₁₂ deficiency, 39.5% combined B₁₂/folate deficiency, 27.14% isolated folate deficiency and 14.3% as being normal. In DiagS 4 the respective values were 19.9%, 24.17%, 42.38% and 22.75%.

In both DiagS, mean levels of all parameter are statistically different between the 4 outcome groups. SCbl and Holo TC levels were lowest and MMA levels highest in the combined deficiency group in both DiagSs. Serum folate was lowest in the isolated folate deficiency group, whereas RBC folate was lowest in the combined deficiency group. They was highest in the combined deficiency group.

Conclusion: The proposed DiagSs which eliminate SCbl and start the screening with Holo-TC after establishing folate status seem to be more precise in detecting functional vitamin B₁₂ deficiency and the combined folate/B₁₂ deficiency in institutionalized elderly. Which of both proposed DiagSs is more precise must be stated in further analysis.

Introduction

In developed countries, clinical vitamin deficiency has mostly disappeared and only affects marginal population groups. May be the only exception in this situation is for vitamin B₁₂, which clinical deficiency, the megaloblastic anemia, affects about 5% of the elderly people (Baessler et al. 2002) in Europe, USA (SEVERAL REF). Also at risk for clinical vitamin B₁₂ deficiency are vegetarians, the more strict vegetarians the more the risk (Krajcovicova-Kudlackova et al. 2000), people suffering from gastritis and chronic consumers of medication for this pathology, like H₂ pump inhibitors (Bradford and Taylor, 1999; Schumann, 1999; Arjona et al. 2002). Subclinical deficiency is quite more prevalent, especially in the elderly (Asselt et al. 1998; Bjorkegren & Svardsudd, 2001; Bates, 2003; Allen, 2004). In the literature there are data ranging from 6 to 40%, but as there is no accepted method for a valid diagnosis of subclinical vitamin B₁₂ deficiency, these data have to be taken with caution. In the general population, the most prevalent vitamin deficiency is for folate that affects both sexes and all age groups (Baessler et al, 2002; Koletzko & Pietrzik, 2004). This means that in the elderly people, folate and vitamin B₁₂ deficiency come together. In fact, the combined folate/vitamin B₁₂ deficiency was supposed to be present in up to 63% of the healthy elderly subjects and up to 83% in elderly hospitalized patients in the study done by Joosten et al. (1993). As both vitamin deficiencies lead to the development of megaloblastic anemia and the clinical diagnosis based on the identification of the hypersegmentation of the nucleus of neutrophiles is common to both deficiencies, it is not possible to differentiate by this method if there is an isolated vitamin B₁₂ or isolated folate deficiency or a combined deficiency (Herbert & Das, 1994), besides that it appears at a later stage. But early diagnosis is decisive, as neurologic symptoms due to vitamin B₁₂ deficiency at an advanced state are irreversible. Therefore, the scientific community is searching for a better diagnostic method, which could be used in the routine clinical laboratory, considering also economical aspects. Normal serum cobalamin (SCbl) does not necessarily reflect a normal B₁₂ status. In several articles, methylmalonic acid (MMA) has been proposed as an alternative diagnostic method for vitamin B₁₂ deficiency. More recently, Holotranscobalamin (Holo TC) has been presented to afford superior diagnostic specificity because it constitutes the biologically functional vitamin B₁₂ fraction. Total

homocysteine (tHcy) has been cited as a marker for blood B vitamin levels. Arguments will be discussed further in this article, but all in all, analysing the available literature, it seems that no single parameter will allow early identification of vitamin B₁₂ deficiency. Therefore, the main objective of our study was to establish a diagnostic scheme in order to try to facilitate early diagnosis and to differentiate between isolated folate, isolated B₁₂ and combined B₁₂/folate deficiency. For this aim, we have used several B₁₂-related parameters measured in Spanish institutionalized elderly among who there was a high prevalence of vitamin B deficiency (Sola et al. 2006, in press).

Material and methods:

Study design

This study is part of a cross-sectional study that aims to establish the vitamin B status of Spanish institutionalized elderly, with special regard to vitamin B₁₂ and folate in association with homocysteine. It has been supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria of the Instituto de Salud Carlos III (Spanish Ministry of Health, FIS PI021830). Briefly, this study includes nutritional assessment by means of the Mini Nutritional Assessment (Guigoz and Hellas, 1996), cognitive analysis by means of the Mini Mental State (Folstein, 1975) and haematological and biochemical data. For this work, from all the analysed variables in the blood, those which are related directly to B₁₂ and folate metabolism were selected, based on clinical criteria and correlation coefficients (Sola et al, 2006, in press). These are: SCbl, Holo-TC, tHcy, serum folate, red blood cell (RBC) folate, and MMA. Morphologic data (lobe average, rule of fives, mean corpuscular volume) were excluded from the diagnostic schemes, because they are not included in the routine praxis of the laboratories, but were analysed afterwards for the several outcomes.

Subjects

Two-hundred and eighteen elderly of both sexes (82 males, 136 females) aged 60-105 (mean age 79.23±8.43 years), living in an Elderly's Home in Granada, Spain, were recruited for the study. The residents who took part in the study were all elderly living at the residence. They

were not taking any vitamin supplement. Anamnesis and blood sampling were included in the biannual medical review that is performed in all the elderly living in the residence. There were no exclusion criteria. None of the volunteers presented any problem that would have justified their exclusion from the study. The study was approved by the Human Research Review Committee of the University of Granada, School of Medicine. The study has been performed following the ethic norms of the Declaration of Helsinki (revision of Edinburgh 2000), Convention of Oviedo, the Good Clinical Practice of the CEE (document 111/3976/88 July 1990) and the Spanish legislation about clinical research in humans (Real Decreto 561/1993 sobre ensayos clínicos).

Blood sampling

After an overnight fast, blood samples were drawn between 8:00 and 10:00 h in the morning. Following venipuncture, 3ml of EDTA-treated blood was analysed within an hour. Two 8 ml vacutainers with gel for serum were put on ice immediately and centrifuged within one hour at 2000 x g and 4°C for 10 min. Following centrifugation they were aliquoted and immediately frozen at -80°C.

Analytical methods

Hematologic and biochemical data were collected with the use of standard methods. Hypersegmentation of the neutrophilic granulocytes was analysed as lobe average and according to the rule of five (Herbert and Colman, 1988). Serum tHcy was measured by a totally automated fluorescence polarisation immunoassay (FPIA; Imx tHcy Kit, Abbot Diagnostic, Abbot Park, IL, USA). Serum folate, RBC folate, and serum cobalamin levels were measured by using the fluorometric method with an Abbot Imx autoanalyser (Abbot Laboratory, Chicago, USA). Holo-TC levels were measured by a radioimmunoassay (HoloTC RIA) provided by Axis-Shield (Oslo, Norway). AMM was analysed by MS-GC.

Statistical analyses

No statistical significant differences ($p > 0.05$) were found between sexes; therefore, all data for both men and women were analysed

together. As not all the variables followed a normal distribution after using the Kolmogorov-Smirnov test, natural log-transformed data were used for calculating Pearson's correlations coefficients. These are shown in Table 1 for the variables included in the further analyses.

The complete set of data was available for 210 subjects. Several segmentation algorithms were drawn and analysed based on the before-mentioned variables. The diagnostic outcome was divided into 4 possible groups: 1) Isolated B₁₂ deficiency. 2) Combined B₁₂-folate deficiency. 3) Isolated folate deficiency. 4) Normal.

For all the variables, categories were established using current reference values for vitamin status (Roe, 1986; Keller and Salkeld, 1988) and professional experience of the authors. That is: for SCbl \leq 200 pg/ml inadequate and $>$ 200 pg/ml adequate; for Holo-TC \leq 45 pmol/L inadequate and $>$ 45 pmol/L adequate; for tHcy $>$ 12 μ mol/L inadequate and \leq 12 μ mol/l adequate; for serum folate (\leq 7 ng/ml inadequate and $>$ 7 ng/ml adequate; for RBC folate \leq 175 ng/ml inadequate and $>$ 175 ng/ml adequate; for AMM \geq 300 nmol/l inadequate and $<$ 300 nmol/l adequate.

Four hierarchical step-by-step classification proposals were developed (Figures 1-4). Variables were chosen following clinical criteria, and the cut-off points used to determine normality or deficiency were those mentioned before.

As both serum folate and RBC folate were confounders in these processes, it was decided that the situation related to folate had to be identified first. Therefore, in all four alternative decision trees the folate status was first identified. The four proposals were formulated organizing the before-mentioned parameters in different order. Diagnostic Scheme (DiagS) 1 (Figure 1) started with SCbl and included 14 possible outcomes of diagnosis. From these outcomes, 10 diagnose a vitamin B₁₂ deficiency (from these, five an isolated B₁₂ deficiency (in yellow) and five combined with folate deficiency (in orange)). DiagS 2 (Figure 2) started with analysis of tHcy and then with Holo-TC and included 12 possible outcomes of diagnosis. From these outcomes, 8 diagnose a vitamin B₁₂ deficiency (four an isolated B₁₂ deficiency (in yellow) and four a combined deficiency (in orange)).

DiagS 3 (Figure 3) started with the analysis of Holo-TC and included 6 possible outcomes. From these outcomes, two diagnose an

isolated B₁₂ deficiency, two a combined deficiency and one an isolated folate deficiency (in green).

DiagS 4 (Figure 4) included a change in the classification methodology, because at the second level of the decision tree, cut-off points for Holo-TC were redefined using intervals (< 40, between 40 and 50, and ≥50), considering the interval between 40 and 50 pmol/l as a grey zone.

Although they are different classification proposals, DiagS1, DiagS2 and DiagS3 give the same results in 98% of the cases after performing cross tabulation. Therefore, and taking into account that DiagS3 is the most simple one because it includes only 3 variables, it is proposed as the optimal one within this group and compared to DiagS4.

In order to decide which of the decision trees is the most adequate one, results were studied statistically by means of: a) Descriptive analysis. Means, dispersion measurements, maximum and minimum and confidence intervals, in order to establish if each of the proposed groups behaves separately in each variable as expected due to its diagnostic classification. B) Box-Jenkins graphs. By means of box plots, behaviour patterns can be observed for each variable in all the groups and within a group. For the within-a-group analysis, variables have been standardized dividing them by the maximum. C) Analysis of the variance in order to assign statistical significance to the analysis performed in A and B. Test for the homogeneity of variance, robust tests for differences of means and multiple comparisons.

All these analysis have been performed for DiagS 3 and 4. The best classifying process will be that one where the groups are best defined in all its variables and also present higher statistical differences. As an additional criterion, DiagS3 and 4 have been compared to the clinical diagnosis made by the physician (haematologist) after studying all the subjects one by one.

Statistical analyses were performed using the SPSS statistical software (version 13.0 for Windows XP; SPSS Inc, Chicago).

Results

Following DiagS 3 (Figure 3), 24 subjects were identified with an isolated B₁₂ deficiency (outcome 1) and 55 with a combined B₁₂ deficiency (outcome 4). With the posterior MMA analysis, 15 (outcome 2) and 28 (outcome 5) subjects, respectively, could be identified. This means that if the only diagnostic criterion would have been the analysis of Holo-TC levels, 43 subjects would not have been identified as being deficient.

Following DiagS 4 (Figure 4), Holo-TC analysis identified 21 subjects with an isolated B₁₂ deficiency (outcome 1). In the grey zone, the MMA analysis identified 3 more cases (outcome 2). In the combined folate- B₁₂ deficiency (outcome 5), the analysis of Holo-TC identified 42 subjects. In the grey zone, the MMA analysis identified 9 more cases (outcome 6). This means that if the MMA analysis would have not been performed, 12 subjects would not have been identified as being deficient.

Taken together, DiagS 3 identified 19.05% isolated B₁₂ deficiency, 39.5% combined B₁₂/folate deficiency, 27.14% isolated folate deficiency and 14.3% as being normal. In DiagS 4 the respective values were 19.9%, 24.17%, 42.38% and 22.75%.

In both DiagSs, mean levels of all parameter are statistically different between the 4 outcome groups (Tables 2 and 3). SCbl and Holo TC levels were lowest and MMA levels highest in the combined deficiency group in both DiagSs. Serum folate was lowest in the isolated folate deficiency group, whereas RBC folate was lowest in the combined deficiency group. They was highest in the combined deficiency group.

In order to be able to discuss which of the DiagSs could be more feasible, data are analysed in several ways. All the parameters have been standardized in order to be comparable and are shown in Figures 5 and 6. Median RBC folate levels are higher in isolated B₁₂ deficiency in DiagS 3 (Figure 3a) than in DiagS 4 (Figure 4a). In the rest of the outcomes, levels and patterns are very similar.

In Tables 7 and 8, descriptive variables for selected haematological data are presented. Statistically significant differences between outcome groups were only for the lobe average in both DiagSs. The mean values for lobe average are shown in Figures 7 and 8. Comparing both DiagS, mean values of combined deficiency and

isolated folate deficiency are closer in DiagS 3 than in DiagS4. In DiagS 3, mean lobe average value in the normal group is higher than that in the isolated B₁₂ deficiency group. For the rest of the variables, mean values are similar in the outcomes of both DiagSs.

Discussion

As has been stated before, especially in the elderly, there is a need to detect at the initial phase vitamin B₁₂ deficiency, because they are at a greater risk for functional B₁₂ deficiency. The clinical presentation of vitamin B₁₂ deficiency varies considerably and rarely includes all the classic features, such as macrocytic anemia, peripheral neuropathy and sub-acute combined degeneration of the spinal cord (Carmel, 2000).

More typically, vitamin B₁₂ deficiency presents as non-specific symptoms fatigue, lassitude, malaise, vertigo, and cognitive impairment that could be attributed to old age and should be avoided by means of early detection. Moreover, the clinical severity of vitamin B₁₂ deficiency is often unrelated to SCbl concentrations. This has been demonstrated in DiagS1, as 92 subjects from our sample would not have been diagnosed if the only diagnostic criterion would have been SCbl levels. This is also confirmed in DiagS 3 and 4, as mean SCbl levels in all 4 outcomes of both diagnostic schemes are above 200 pg/ml, the cut-off used in several publications in the literature (Chanarin, 1979). This means, that functional deficiency occurs even in people whose SCbl levels are in the normal (ie reference) range. In the isolated vitamin B₁₂ deficiency group of DiagS 3, mean SCbl levels are even above 300 pg/ml, the cut-off used by Pennypacker et al. (1992) studying geriatric patients in Denver.

Concerns about the limitations of standard vitamin B₁₂ assays have been stated before (Carmel, 2000; Stabler, 2000). Holo-TC has been proposed in the literature as a more sensitive parameter (Wickramasinghe et al, 1993; Nexo et al, 2002; Herzlich et al, 1988; Lindenbaum et al, 1990; Hvas & Nexo, 2005). Mean Holo TC levels are below 35 pmol/l in the isolated B₁₂ and in the combined deficiency group in DiagS4 (Table 3). The cut-off of 35 pmol/l has been proposed by several authors (Hermann et al, 2003). In fact, we found a strong correlation ($r= 0.656$; $p<0.01$) between Holo-TC and SCbl.

DiagS3 is more related to the diagnosis made by the haematologist when comparing the results by crosstabulation (Table 5). The haematologist included SCbl levels and tHcy levels for his diagnosis. This could explain some of the differences found with the classifying processes. But analysing haematological data, DiagS4 gives better results than DiagS3, especially for the lobe average, which could be an indicator for the initial phase of megaloblastic anaemia. In several publications in the literature, no relationship has been found between haematological and biochemical data in elderly when analysing vitamin B₁₂ status. So, this fact needs further analysis.

The clinical-economical advantage of DiagS 4 is that less MMA analysis have to be performed. MMA analysis is very expensive and the MS-GC method is complicated and not possible in the routine laboratory. There are several other physiological/pathological conditions where MMA is elevated, not only in B₁₂ deficiency. Furthermore, in the 93 subjects with MMA \geq 300 pmol/l, mean SCbl levels were 317.24 \pm 228 pg/ml and mean Holo TC levels were 54.63 \pm 46.3 pmol/l. The advantage of Holo TC is that is specific for cobalamin metabolism and that the analysis can be performed in the routine laboratory. Mean tHcy levels were 17.9 \pm 6.66 μ mol/l. MMA and Holo TC have a highly significant correlation ($r=0.500$; $p<0.01$) (Table 1).

The advantage of the diagnostic schemes proposed in this paper is that they permit not only to identify subclinical deficiencies, but also to distinguish between isolated B₁₂, isolated folate or combined B₁₂/folate deficiency. This diagnosis is important for the therapeutic treatment. The serum concentrations of the vitamins taken by their own can not give such specific information. On the other hand, as adequate cut-off points for blood parameters are still controversial, the decision tree seems to be a more adequate identification method.

Which of the decision trees is the most adequate one must to be analysed further with more data. Perhaps it would be necessary to study a group of elderly in which B₁₂ deficiency is not so highly prevalent. But in the meantime, using one of the DiagS seems to be more adequate than analysing data separately.

References

- Arjona Mateos, C.R., Criado Velasco, J. and Sánchez Solís, L. (2002) Enfermedades crónicas y consumo de fármacos en mayores de 65 años. *Med. Gen.* 47, 684-695.
- Allen LH. Folate and vitamin B12 status in the Americas. *Nutr Rev* 2004;62(6 Pt 2):S29-33.
- Bässler KH, Golly I, Loew K, Pietrzik K. *Vitamin-Lexikon*. Govi Verlag, Frankfurt-Main. 2002.
- Bates, C.J., Schneede, J., Mishra, G., Prentice, A., Mansoor, M.A. (2003) Relationship between methylmalonic acid, homocysteine, vitamin B12 intake and status and socio-economic indices, in a subset of participants in the British National Diet and Nutrition Survey of people aged 65 and older. *Eur J Clin Nutr* 57, 349-357.
- Bjorkegren, K., Svardsudd, K. (2001) Serum cobalamin, folate, methylmalonic acid and total homocysteine as vitamin B₁₂ and folate deficiency markers amongst elderly Swedes – a population-based intervention study. *J. Intern. Med.* 246, 317- 324.
- Bradford, G.S. and Taylor, C.T. (1999) Omeprazole and vitamin B12 deficiency. *Ann. Pharmacother.* 33, 641-643.
- Carmel, R. (2000) Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu Rev Med* 51, 357-375.
- Chanarin I. *The Megaloblastic Anaemias*. 2nd ed. Oxford, England. Blackwell Scientific Publishers:1979.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12(3):189-98.
- Guigoz Y, Vellas B, Garry PJ. Assessing the nutritional status of the elderly: The Mini Nutritional Assessment as part of the geriatric evaluation. *Nutr Rev* 1996;54(1 Pt 2):S59-65.
- Herbert VD, Colman N. Folic acid and vitamin B12. In: ME Shils, JA Olson, M Shike, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 7th edition. Malvern, PA: Lea & Febiger, 1988, pp 388-416.

Herbert V, Das KC. Folic acid and vitamin B12. En: ME Shils, JA Olson, M Shike, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 8th edition. Malvern, PA: Lea & Febiger, 1994, pp 402-425.

Hermann W, Obeid R, Schorr H, Geisel J. Functional vitamin B12 deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1478-88.

Herzlich B, Herbert V. Depletion of serum holotranscobalamin II. An early sign of negative vitamin B₁₂ balance. *Lab Invest* 1988;58:332-337.

Hvas AM, Nexø E. Holotranscobalamin—a first choice assay for diagnosing early vitamin B deficiency? *J Intern Med*. 2005;257(3):289-98.

Keller HE, Salkeld RM. Bereichswerte von Analysenparametern fuer den Vitaminstatus. *GCR* 1988; 106:334.

Koletzko B, Pietrzik K: Gesundheitliche Bedeutung der Folsäurezufuhr. *Deutsches Ärzteblatt* 2004; 101:A1670-1681.

Krajcovicova-Kudlackova M, Blazicek P, Kopcova J, Bederova A, Babinska K. Homocysteine levels in vegetarians versus omnivores. *Ann Nutr Metab* 2000;44(3):135-8.

Joosten, E., van den Berg, A., Riezler, R., Naurath, H.J., Lindenbaum, J., Stabler, S.P., Allen, R.H. (1993) Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B₁₂ (cobalamin), folate and vitamin B₆ occur commonly in elderly people. *Am J. Clin. Nutr.* 58, 468-476.

Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, et al. Diagnosis of cobalamin deficiency. II: relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990;34:99-107.

Nexo E, Christensen AL, Hvas AM, Petersen TE, Fedosov SN. Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B₁₂ deficiency. *Clin Chem* 2002;48:561-562. Pennypacker LC, Allen RH, Kelly JP, Mathews LM, Grigsby J, Kaye K, Lindenbaum J, Stabler SP. High prevalence of cobalamin deficiency in elderly outpatients. *J Am Geriatr Soc* 1992; 40(12): 1197-204.

Roe DA. Nutritional assessment of the elderly. *World Rev Nutr Diet* 1986;48:85-113.

Schumann, K. (1999) Interactions between drugs and vitamins at advanced age. *Int. J. Ital. Nutr. Res.* 69, 173-178.

Sola R, Gonzalez-Gross M, Albers U, Barrios L, Alder M, Pietrzik K, Castillo MJ. B-Vitamins and Homocysteine in Spanish institutionalized elderly. *Int J Vit Nutr Res* (in press)

Stabler, S.P. (2000) B₁₂ and nutrition. In: Banerjee R, ed. *Chemistry and biochemistry of B₁₂*. New York: John Wiley and Sons, 2000, pp 343-65.

Van Asselt, D.Z., de Groot, L.C., van Staveren, W.A., Blom, H.J., Wevers, R.A., Biemond, I., Hoefnagels, W.H. (1998) Role of cobalamin intake and atrophic gastritis in mild cobalamin deficiency in older Dutch subjects. *Am J Clin Nutr* 68, 328-334.

Wickramasinghe SN, Fida S. Correlations between holotranscobalamin II, holo-haptocorrin, and total B₁₂ in serum samples from healthy subjects and patients. *J Clin Pathol* 1993;46:537-539.

MTHFR

EFECTO DEL POLIMORFISMO DE LA MTHFR EN EL DEFICIT DE FOLATOS E HIPERHOMOCISTEINEMIA EN ANCIANOS INSTITUCIONALIZADOS.

Ricardo Sola^{1,3}, Marcela Gonzalez-Gross^{2,3,4}, Jonatan R Ruiz³, Miguel García-Fuentes, Laura Barrios, Klaus Pietrzik⁴, Manuel J Castillo³

¹Servicio de Hematología. Hospital Clínico San Cecilio. Granada. Spain

²Facultad de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte, Universidad Politécnica de Madrid. Spain.

³Grupo Effects 262. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. Spain

⁴Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften - Ernährungsphysiologie. Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität. Germany.

Introducción:

El folato es un cofactor esencial en la síntesis de ADN y en las reacciones de metilación dando lugar en caso de déficit a hiperhomocisteinemia. Los niveles inadecuados de folato, se asocian con un amplio espectro de entidades clínicas que comprenden alteraciones hematológicas, anemia megaloblástica, asociada o no a leucopenia y/o trombopenia e hipersegmentación neutrófila, estomatitis o glositis y manifestaciones neurológicas y deterioro cognitivo¹.

En los últimos años, su deficiencia debido a la hiperhomocisteinemia que provoca parece estar asociada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares^{2,3,4}, defectos del tubo neural⁵, complicaciones en el embarazo⁶, enfermedad de Alzheimer⁷, fracturas⁸ y de ciertas neoplasias⁹.

El folato sérico (FS) y el folato intraeritrocitario (FE), son indicadores de los niveles de esta vitamina. El último refleja la concentración y suministro a largo plazo, mientras que el FS está directamente relacionado con la ingesta reciente. El FE es captado por los eritrocitos en desarrollo de la médula ósea y circula en la sangre durante los ciento veinte días de vida de la célula madura. El FE no permite la detección de cambios recientes o transitorios en la ingesta de folato. Por tanto en el ser humano, niveles de

folato bajos se pueden detectar después de 120 días de deficiencia en la ingesta o defecto de absorción. En contraposición el FS es un buen indicador de la ingesta de esta vitamina a corto plazo y valores bajos se pueden detectar en las dos primeras semanas de iniciada la deficiencia ya sea por falta de ingesta, defectos en la absorción del mismo, ingesta de alcohol y ciertos medicamentos.

Recientemente se han descubierto factores genéticos que podrían afectar los niveles de FS y FE, como la sustitución C → T en la posición 677 que codifica la Metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR), enzima encargada de reducir el 5,10 Metilentetrahidrofolato a 5-Metiltetrahidrofolato, principal forma en que el folato circula en el organismo. La C677T, es la mutación más frecuente de las que afectan a la MTHFR¹⁰. Entre el 5 y el 15% de las personas normales son homocigotos para la mutación C677T en el gen de la MTHFR, que se relaciona con el aumento de homocisteína en plasma y una redistribución de folatos en el organismo, con un FS disminuido¹¹, mientras que con el FE no hay consenso, para unos autores estará disminuido¹², mientras que para otros estará aumentado¹³.

Además se han descubierto polimorfismos en los genes que codifican las proteínas involucradas en la absorción y transporte del folato y que comprenden un intercambio de base en el gen del transportador de folato reducido G80A y un intercambio de base menos frecuente que codifica la glutamato carboxipeptidasa C1561T.

Objetivos:

El objetivo del presente trabajo ha sido establecer la posible relación entre las concentraciones plasmáticas de homocisteína, FS y FE en un grupo de ancianos institucionalizados y el genotipo C677T del gen de la MTHFR.

Métodos:

Se estudiaron 218 ancianos, 82 hombres y 136 mujeres con edades comprendidas entre los 60 y 102 años. Tras un ayuno de doce horas y por punción en la vena cubital, se extrae la sangre, distribuyéndola en un tubo con EDTA para hematimetría completa en el ADVIA-120 de Bayer, morfología eritrocitaria, hipersegmentación neutrófila y folato

intraeritrocitario (IMX Abbott). 8 cc de sangre se depositaron en tubos con gel para la obtención de suero que se depositaron en baño con hielo y se centrifugaron antes de 1 hora para la determinación de bioquímica completa (Hitachi 911 Roche), vitamina B₁₂, folato sérico, homocisteína total (tHcy) en el IMX de Abbott, holotranscobalamina II (Holo-TC-II) (RIA, Axis-Shiel) y ácido metilmalónico (AMM), 4 cc en un tubo de sangre total heparinizada para la determinación de la vitamina B₆. Las muestras de suero que no se procesaron inmediatamente se congelaron a - 80° C hasta su posterior análisis.

Con 500 µL de sangre total anticoagulada con EDTA se realizó extracción de ADN mediante el Qiagen, procedimiento descrito por Higuchi (1989) y posteriormente se estudio el polimorfismo de la C677T de la MTHFR mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior digestión y amplificación con la enzima de restricción Hinf-I (GE Healthcare) como fue descrito por Frosst et al (1995).

Los participantes completaron un cuestionario que permitió determinar sus hábitos alimenticios en el último año (Mini Nutricional Assessment MNA). Por último la entrevista puso de manifiesto sus hábitos tabáquicos, actividad física e ingesta de medicamentos de las 4 últimas semanas. Los autores analizaron la relación entre FS y FE, así como la asociación entre ellos y los factores que podrían modificar sus concentraciones. También se realizó un estudio del deterioro cognitivo mediante el Mini Mental Test (MMT).

Análisis estadístico:

Debido a la asimetría en la distribución de las variables bioquímicas, se procedió a su transformación logarítmica consiguiéndose una distribución normal de estas. El análisis estadístico se hizo con las formas logarítmicas de las variables aunque en las tablas se representarán los valores de la concentración de las variables en su forma antilogarítmica.

Se aplicó la prueba de la t de Student para estudiar el efecto de la mutación de la MTHFR en las concentraciones de tHcy, FS y FE. Por otra parte, se realizó análisis de la varianza (ANOVA) para estimar el efecto de los polimorfismo estudiados. Los cálculos estadísticos se realizaron con la versión 12 del programa SPSS para Windows.

Resultados:

De los 218 sujetos, se diagnosticaron 175 ancianos con tHcy > 12 $\mu\text{mol/l}$. 106 (43.11%) con folato sérico ≤ 6 ng/ml y con folato intraeritrocitario ≤ 175 ng/ml 13 (7.33%), de estos 16 tienen ambos bajos, lo que representa 119 ancianos deficientes que representan el 54.84 % de prevalencia de déficit de folato. 38 ancianos (7.33%) tienen una B₁₂ sérica ≤ 200 pg/ml, 52 ancianos (23,85 %) tienen una Holo-TC ≤ 45 y 29 un AMM ≥ 300 , lo que representa una prevalencia para el déficit de vitamina B₁₂ de 119 ancianos que representan el 54,84% de la población estudiada. Déficit mixto B₁₂-folato, 76 ancianos (34,86 %).

En un análisis de regresión lineal múltiple el log del FS ($r = - 0.285$ $p < 0.01$) es el más fuerte predictor independiente de hiperhomocisteinemia (log tHcy), seguido del log del FE ($r = - 0.269$ $p < 0.01$), log AMM ($r = 0.315$ $p < 0.01$), log Holo-TC ($r = - 0.239$ $p < 0.01$), log B₆ ($r = - 0.083$ $p < 0.05$) y por último log B₁₂ ($r = - 0.171$ $p < 0.05$).

El análisis no reveló diferencias significativas entre hombres y mujeres, por lo que el estudio se realizó sin tener en cuenta el sexo. El diagrama de dispersión demostró la relación lineal entre FS y FE. El análisis demostró correlaciones positivas importantes entre FS y FE ($p < 0.01$). Similares hallazgos se observaron con el FE, aunque de menor magnitud.

El análisis de varianza (ANOVA) del FS, FE y tHcy según el polimorfismo de la MTHFR, mostró con el test de Scheffé una diferencia en las medias significativas ($p < 0.05$) entre el FE del polimorfismo normal y del homocigoto exclusivamente.

En nuestro estudio 31 sujetos presentaron el genotipo homocigoto de la MTHFR (677TT), lo que representa el 14 %, 16 hombres y 15 mujeres, presentaron unos niveles más elevados de FE comparados con el polimorfismo heterocigoto (677CT) y normal (677CC). El polimorfismo de la MTHFR 677CT tuvo un efecto pronunciado en la correlación entre FS, FE y tHcy; en los sujetos normales (677CC), el FS, se correlaciono exclusivamente y de forma inversa con la tHcy ($r = - 0.416$ $p < 0.05$), mientras que en los heterocigotos (677CT), el FS se correlaciono de forma directa con el FE ($r = 0.535$ $p < 0.01$) y de forma inversa con la tHcy ($r = - 0.308$ $p < 0.01$) y por último en la forma homocigoto (677TT) se correlaciono el FS y FE de forma directa ($r = 0.529$ $p < 0.01$) pero no con la tHcy.

Conclusiones:

Concentraciones medias de tHcy, están influenciadas por la edad, estado nutricional, estilo de vida y factores genéticos. En el presente estudio utilizando el test no paramétrico de Kruskal Wallis y el análisis post hoc de Bonferoni para las variables transformadas (tabla) y coincidiendo con otros autores ¹⁴, no se han podido establecer diferencias significativas en las concentraciones medias de tHcy ($p = 0.600$) y de FS ($p = 0.631$). Sin embargo, se han encontrado diferencias significativas en el FE ($p = 0.021$) entre los grupos con distinto polimorfismo en la MTHFR, estas diferencias significativas son más fuertes entre individuos normales y homocigotos ($p = 0.025$) que entre heterocigotos y homocigotos ($p = 0.071$). Se deduce de este estudio que las concentraciones de FS y tHcy no están influenciadas por el polimorfismo de la MTHFR y sí el FE. Por tanto en individuos homocigotos puede haber un FE elevado, parece ser que por acumulo intracelular de folato, bajo una forma que no es el metiltetrahidrofolato, los folatos acumulados no participan en el ciclo de la metilación ni en la síntesis de DNA¹³. Sería importante en individuos homocigotos analizar las distintas formas de folatos intraeritrocitarios para diagnosticar el estado deficitario.

Bibliografia:

1. Stabler, S.P., Allen, R.H., Savage, D.G., & Lindenbaum, J. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. *Blood* 1990; 76: 871–881.
2. Boushey, C. J., Beresford, S. A., Omenn, G. S. & Motulsky, A. G. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increased folic acid intakes. *J. Am. Med. Assoc.* 1995; 274: 1049–1057.
3. The Homocysteine Studies Collaboration Homocysteine and risk of ischemic heart disease. A meta analysis. *J. Am. Med. Assoc.* 2002; 288: 2015–2023.
4. Wald, D. S., Law, M. & Morris, J. K. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *Br. Med. J.* 2002; 325: 1202–1208.
5. Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels JMF, et al. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? *Metabolism.* 1994; 43: 1475-1480
6. Hague WM. Homocysteine and pregnancy. *Best Practice Res Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17: 459–469.
7. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B₁₂, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 1998; 55: 1449-1455.
8. McLean RR, Jacques PF, Selhub J et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 2004; 350: 2042–9.
9. Pietrzik K, Brönstrup A. Folate in preventive medicine: a new role in cardiovascular disease, neural tube defects, and cancer. *Ann Nutr Metab* 1997; 41: 331-343.
10. De Bree A, Verschuren WMM, Bjorke-Monsen AL, Van der Put NMJ, Heil SG, Trijbels FJM, et al. Effect of methylenetetrahydrofolate reductasa 677C-T mutation on the relation among folate intake and plasma folate and homocysteine concentration in a general population sample. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 667-93.

11. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995; 10: 111-113.
12. Leo A, J Kluijtmans, Ian S. Young, Colin A. Boreham, Liam Murray, Dorothy McMaster, Helene McNulty, J.J. Strain, Joseph McPartlin, John M. Scott, and Alexander S. Whitehead. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood.* 2003; 101: 2483-88.
13. Bagley, P. J. & Selhub, J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95:13217–13220.
14. Delvin EE, Rozen R, Merouani A, Genest J, Lamber M. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase genotype, age, vitamin B₁₂ and folate status on plasma homocysteine in children. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 469-73.

Tablas y gráficos:

Concentraciones de FS, FE y tHcy según el polimorfismo de la MTHFR

	Normal (N = 54)	Heterocigoto (N = 104)	Homocigoto (N = 31)	P
FS (ng/ml)	6.08 (2.68-18.29) ¹	6.10 (2.66-16.20)	5.30 (2.63-16.34)	NS ¹
Log FS	1.82 ± 0.58 ²	1.81 ± 0.49	1.79 ± 0.52	NS ²
FE (ng/ml)	252.5 (66.8-652.05)	270 (88.15-754.6)	359 (122.6-1138)	0.05
Log FE	5.53 ± 0.55 ^a	5.61 ± 0.57	5.84 ± 0.6	< 0.05
tHcy (µmol/l)	16.15 (7.15-26.81)	15.6 (9.78-27.59)	16.64 (4.65-50.0)	NS
Log tHcy	2.71 ± 0.35	2.77 ± 0.40	2.72 ± 0.61	NS

¹ Kruskal Wallis- test (no paramétrico)

² ANOVA con post hoc Bonferoni

^a significativo con el grupo homocigoto

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: logfoler

Bonferroni

(I) MTHFR	(J) MTHFR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Normal	Normal					
	Heterocigoto	-,07741	,09631	1,000	-,3101	,1553
	Homocigoto	-,32683(*)	,12960	,038	-,6399	-,0138
Heterocigoto	Normal	,07741	,09631	1,000	-,1553	,3101
	Heterocigoto					
	Homocigoto	-,24942	,11756	,106	-,5334	,0346
Homocigoto	Normal	,32683(*)	,12960	,038	,0138	,6399
	Heterocigoto	,24942	,11756	,106	-,0346	,5334
	Homocigoto					

* La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

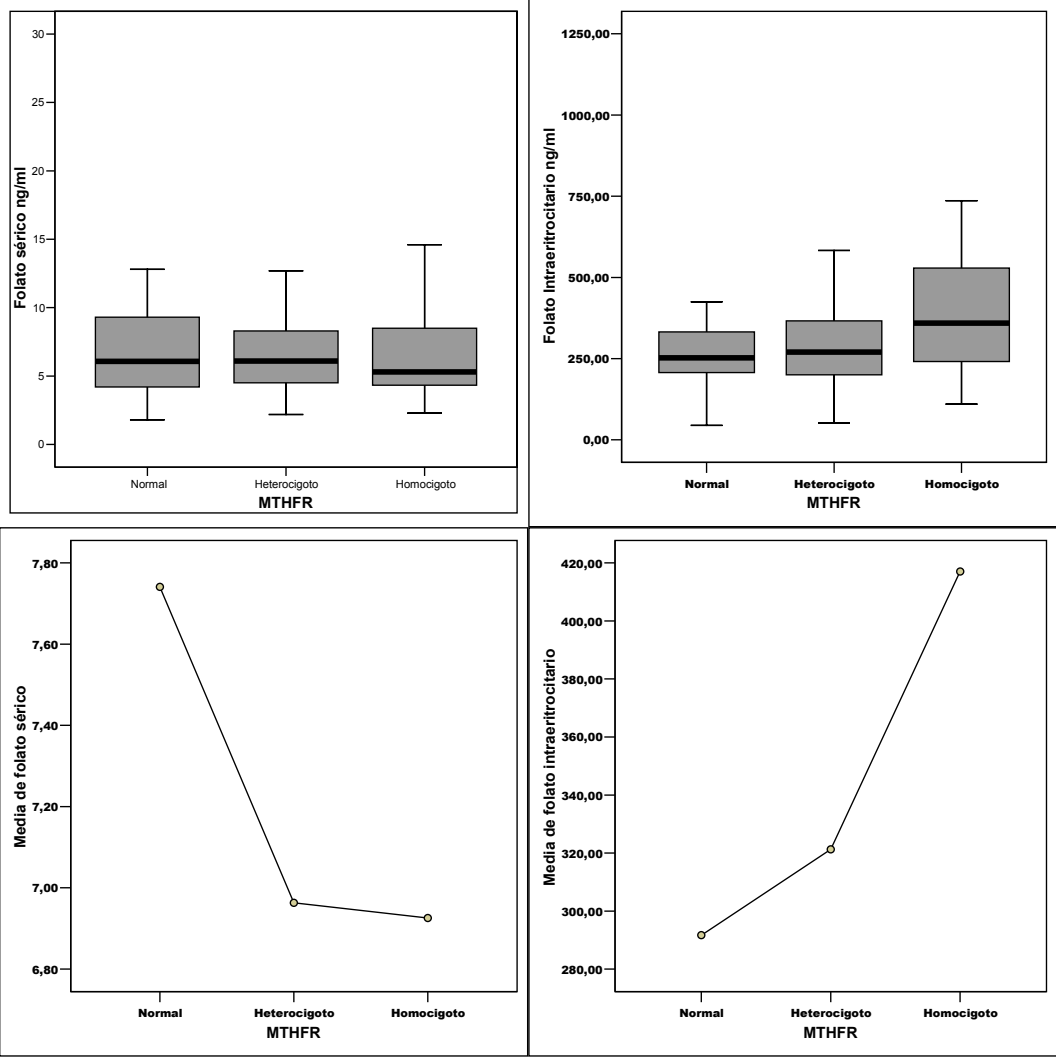


Tabla 1. Plasma total homocysteine (tHcy), serum folate and red blood cell

	MTHFR 677C>T genotype			P-value ¹
	CC (n=54, 28%)	CT (n=105, 55%)	TT (n=31, 16%)	
tHcy (μmol/L)	16±5.5	18.5±19.2	17.6±10.0	0.941
Serum Folate (ng/mL)	7.7±7.5	7.0±3.7	6.9±4.0	0.497
RBC Folate (nmol/L)	291.7±164.7	321.2±200.9	417.1±260.7*	0.039

(RBC) folate concentration according to MTHFR (677C>T) genotype.

Values are mean ± SD.

¹P-value is based on one-way analysis of variance for differences between means.

*Significantly different from CC (P < 0.05) by Tukey's test.

Table 2. Plasma total homocysteine (tHcy) concentration according to MTHFR (677C>T) genotype, and serum folate status.

	MTHFR 677C>T genotype			P-value ¹
	CC	CT	TT	
<i>Serum Folate <6.10 (ng/mL)</i>				
tHcy (μmol/L)	19.0±5.4	18.3±6.3	16.2±6.0	0.34
<i>Serum Folate >6.10 (ng/mL)</i>				
tHcy (μmol/L)	13.0±3.8	15.4±4.6	14.3±4.1	0.08
P-value ¹	>0.001	0.008	0.34	

Values are mean ± SD.

¹P-value is based on two-way analysis of variance for differences between means.

*Borderline different from CC (P = 0.069) by Tukey's test.

Table 3. Plasma total homocysteine (tHcy) concentration according to MTHFR (677C>T) genotype, and serum folate status.

	MTHR 677C>T genotype			P-value ¹
	CC	CT	TT	
<i>Serum Folate <4 (ng/mL)</i>				
tHcy (μmol/L)	18.4±5.7	26.6±5.8	17.9±9.3	0.54
<i>Serum Folate 4-6 (ng/mL)</i>				
tHcy (μmol/L)	18.2±5.6	16.6±5.8**	15.2±3.1	0.33
<i>Serum Folate >6 (ng/mL)</i>				
tHcy (μmol/L)	12.9±3.7*	15.2±4.5 [†]	14.3±4.1	0.13
P-value ¹	0.001	0.002	0.39	

Values are mean ± SD.

¹P-value is based on two-way analysis of variance for differences between means.

*Significantly different from serum folate <4 ng/mL (P = 0.010), and serum folate 4-6 ng/mL (P = 0.002) by Tukey's test.

**Significantly different from serum folate <4 ng/mL (P = 0.022) by Tukey's test.

[†]Significantly different from serum folate <4 ng/mL (P = 0.002) by Tukey's test.

Table 4. Plasma total homocysteine (tHcy) concentration according to MTHFR (677C>T) genotype, and red blood cell (RBC) folate concentration.

	MTHR 677C>T genotype			P-value ¹
	CC	CT	TT	
<i>RBC Folate <270 (nmol/L)</i>				
tHcy (μmol/L)	17.4±5.3	17.9±5.9	14.4±5.6	0.24
<i>RBC Folate >270 (nmol/L)</i>				
tHcy (μmol/L)	14.2±5.4	15.4±5.1	15.8±5.2	0.55
P-value ¹	0.037	0.022	0.34	

Values are mean ± SD. tHcy means total plasma homocysteine.

¹P-value is based on two-way analysis of variance for differences between means.

Table 5. Plasma total homocysteine (tHcy) concentration according to MTHFR (677C>T) genotype, and serum folate status.

	MTHFR 677C>T genotype			P-value ¹
	CC	CT	TT	
<i>RBC Folate <150 (nmol/L)</i>				
tHcy (μmol/L)	15.3±5.2	17.1±5.4	11.4±4.0	0.54
<i>RBC Folate 150-250 (nmol/L)</i>				
tHcy (μmol/L)	20.6±4.6	16.9±5.8**	13.7±3.8 [§]	0.33
<i>RBC Folate >250 (nmol/L)</i>				
tHcy (μmol/L)	7.0±8.1*	17.2±4.6 [†]	14.7±4.5	0.13
P-value ¹	0.023	<0.001	0.025	

Values are mean ± SD.

¹P-value is based on two-way analysis of variance for differences between means.

*Significantly different from RBC folate 150-250 nmol/L (P = 0.018) by Tukey's test.

**Significantly different from RBC folate <150 nmol/L (P = 0.032) by Tukey's test.

[†]Significantly different from RBC folate <150 nmol/L (P < 0.001), and from RBC folate 150-250 nmol/L (P = 0.039) by Tukey's test.

[§]Significantly different from RBC folate <150 nmol/L (P = 0.023) by Tukey's test.

Table 6. Plasma total homocysteine (tHcy) concentration according to MTHFR (677C>T) genotype, and tHcy cutoff points.

	MTHR 677C>T genotype			P-value ¹
	CC	CT	TT	
<i>tHcy <15.76 (μmol/L)</i>				
tHcy (μmol/L)	11.8±2.6	12.4±2.1	11.3±3.6	0.26
<i>tHcy <15.76 (μmol/L)</i>				
tHcy (μmol/L)	20.2±4.2	21.2±4.6	19.1±3.4	0.24
P-value ¹	>0.001	>0.001	>0.001	

Values are mean ± SD. tHcy means total plasma homocysteine.

¹P-value is based on two-way analysis of variance for differences between means.

Correlaciones MTHFR HETEROCIGOTO

		Folato_ser_ ng/ml	Folato_intra_ ng/ml	Homocistein a_mcmol/L	logfols	logfoler	loghomo
Folato_ser_ng/ml	Correlación de Pearson	1	,695**	-,122	,955**	,583**	-,285**
	Sig. (bilateral)		,000	,213	,000	,000	,003
	N	105	105	105	105	105	105
Folato_intra_ng/ml	Correlación de Pearson	,695**	1	-,169	,604**	,912**	-,281**
	Sig. (bilateral)	,000		,084	,000	,000	,004
	N	105	105	105	105	105	105
Homocisteina_mcmol/L	Correlación de Pearson	-,122	-,169	1	-,119	-,227*	,809**
	Sig. (bilateral)	,213	,084		,227	,020	,000
	N	105	105	105	105	105	105
logfols	Correlación de Pearson	,955**	,604**	-,119	1	,535**	-,308**
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,227		,000	,001
	N	105	105	105	105	105	105
logfoler	Correlación de Pearson	,583**	,912**	-,227*	,535**	1	-,367**
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,020	,000		,000
	N	105	105	105	105	105	105
loghomo	Correlación de Pearson	-,285**	-,281**	,809**	-,308**	-,367**	1
	Sig. (bilateral)	,003	,004	,000	,001	,000	
	N	105	105	105	105	105	105

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

Correlaciones MTHFR HOMOCIGOTA

		Folato_ser_ ng/ml	Folato_intra_ ng/ml	Homocistein a_mcmol/L	logfols	logfoler	loghomo
Folato_ser_ng/ml	Correlación de Pearson	1	,628**	-,355	,962**	,541**	-,154
	Sig. (bilateral)		,000	,058	,000	,002	,408
	N	31	31	29	31	31	31
Folato_intra_ng/ml	Correlación de Pearson	,628**	1	-,041	,570**	,937**	-,089
	Sig. (bilateral)	,000		,833	,001	,000	,633
	N	31	31	29	31	31	31
Homocisteina_mcmol/L	Correlación de Pearson	-,355	-,041	1	-,370*	,043	,883**
	Sig. (bilateral)	,058	,833		,048	,825	,000
	N	29	29	29	29	29	29
logfols	Correlación de Pearson	,962**	,570**	-,370*	1	,529**	-,127
	Sig. (bilateral)	,000	,001	,048		,002	,496
	N	31	31	29	31	31	31
logfoler	Correlación de Pearson	,541**	,937**	,043	,529**	1	-,082
	Sig. (bilateral)	,002	,000	,825	,002		,662
	N	31	31	29	31	31	31
loghomo	Correlación de Pearson	-,154	-,089	,883**	-,127	-,082	1
	Sig. (bilateral)	,408	,633	,000	,496	,662	
	N	31	31	29	31	31	31

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

Correlaciones del FS y FE con la tHcy, según el polimorfismo de la MTHFR

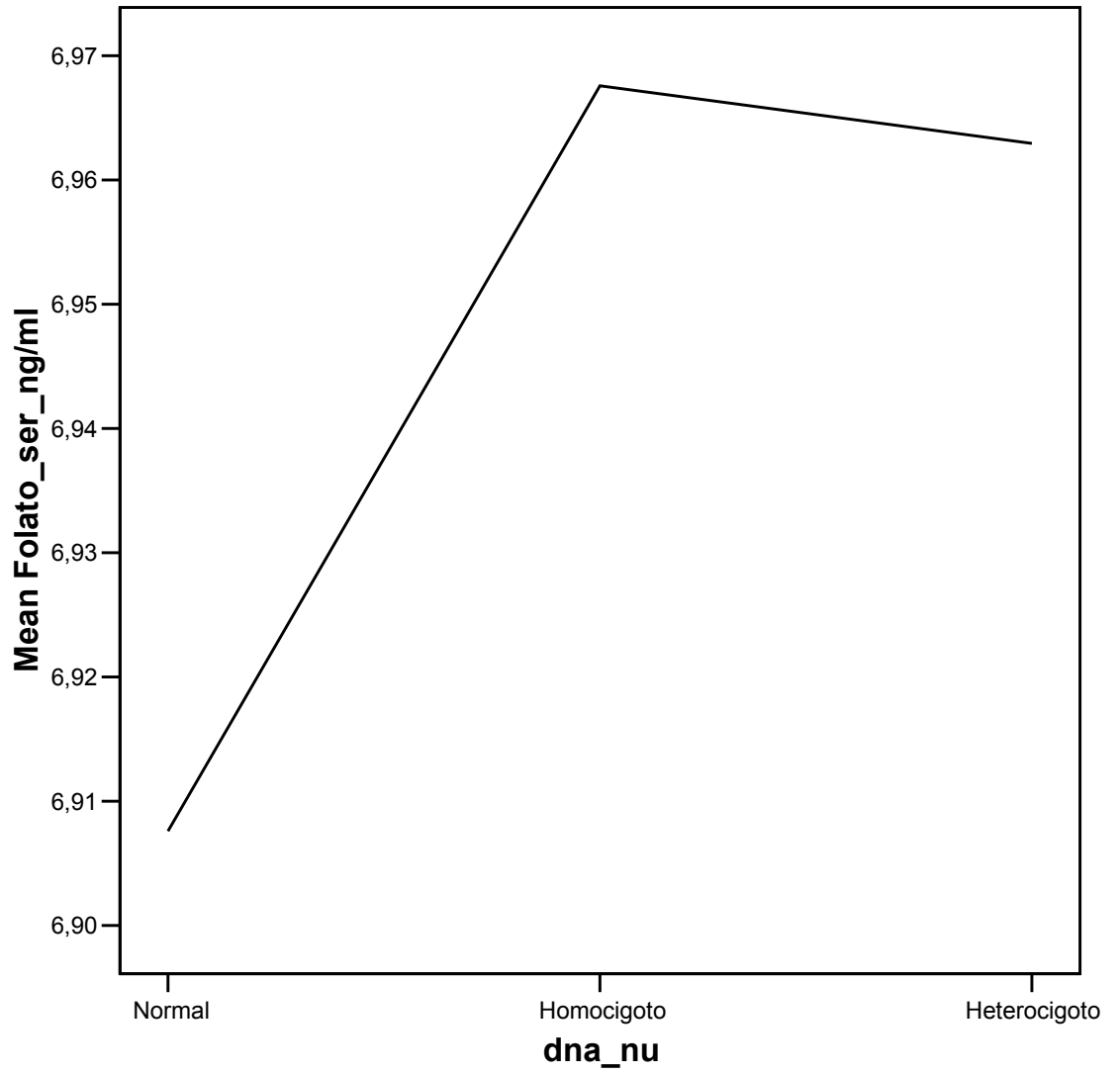
	CC	CT	TT
FS r = - 0.355	r = - 0.269 (p < 0.05)	r = - 0.122	
FE r = - 0.041	r = - 0.304 (p < 0.05)	r = - 0.169	

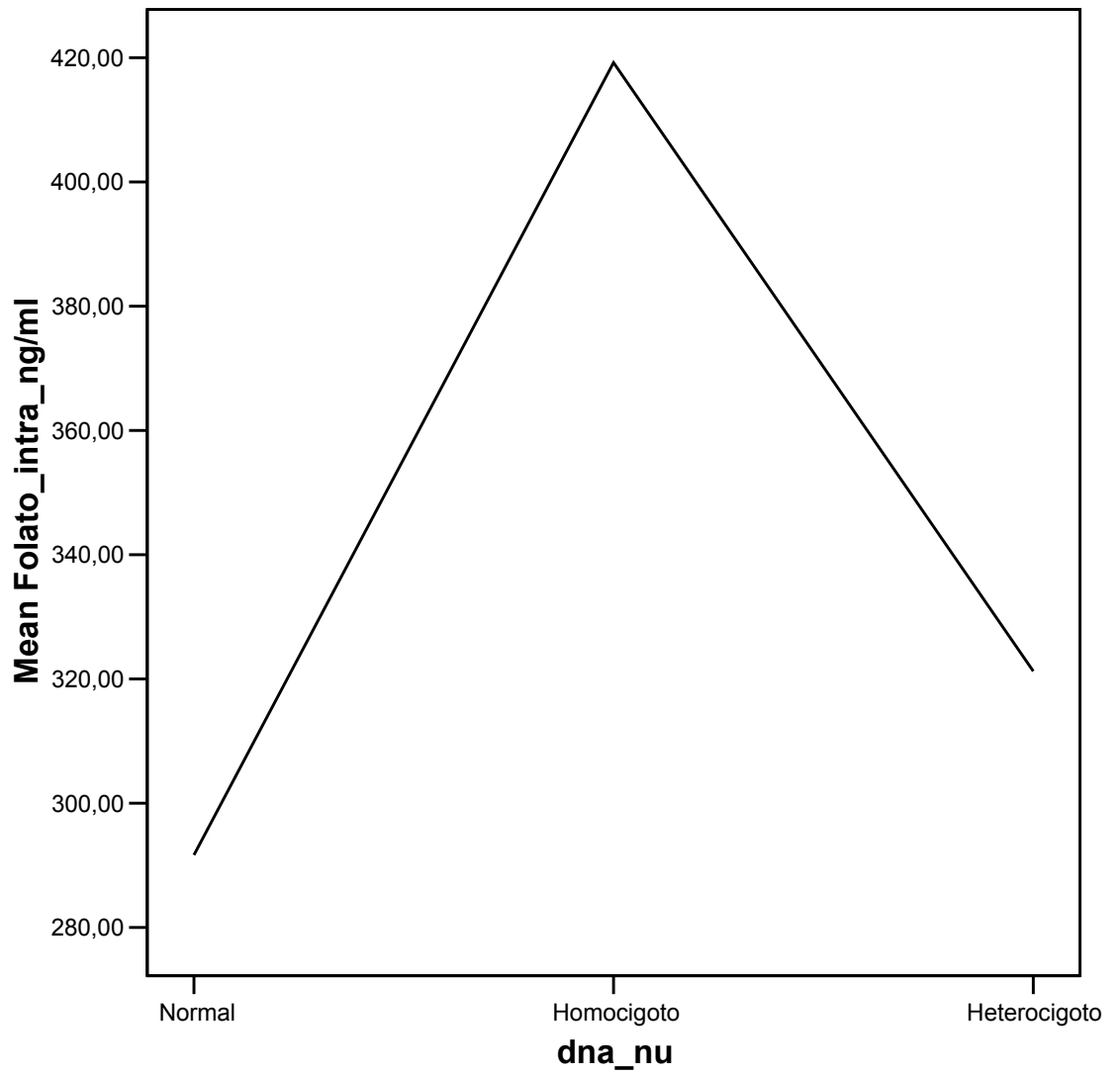
Comparaciones múltiples

Scheffé

Variable dependiente	(I) R_MTHFR	(J) R_MTHFR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Folato_ser_ng/ml	Normal	Heterocigoto	,77797	,85283	,660	-1,3264	2,8823
		Homocigoto	,81512	1,14759	,777	-2,0165	3,6468
	Heterocigoto	Normal	-,77797	,85283	,660	-2,8823	1,3264
		Homocigoto	,03715	1,04099	,999	-2,5315	2,6058
	Homocigoto	Normal	-,81512	1,14759	,777	-3,6468	2,0165
		Heterocigoto	-,03715	1,04099	,999	-2,6058	2,5315
Folato_intra_ng/ml	Normal	Heterocigoto	-29,58291	33,91834	,684	-113,2759	54,1101
		Homocigoto	-125,40202	45,64143	,025	-238,0215	-12,7825
	Heterocigoto	Normal	29,58291	33,91834	,684	-54,1101	113,2759
		Homocigoto	-95,81911	41,40201	,071	-197,9779	6,3397
	Homocigoto	Normal	125,40202	45,64143	,025	12,7825	238,0215
		Heterocigoto	95,81911	41,40201	,071	-6,3397	197,9779
Homocisteina_mcmol/L	Normal	Heterocigoto	-2,56798	2,53879	,600	-8,8324	3,6964
		Homocigoto	-1,62152	3,41626	,894	-10,0511	6,8081
	Heterocigoto	Normal	2,56798	2,53879	,600	-3,6964	8,8324
		Homocigoto	,94646	3,09894	,954	-6,7001	8,5931
	Homocigoto	Normal	1,62152	3,41626	,894	-6,8081	10,0511
		Heterocigoto	-,94646	3,09894	,954	-8,5931	6,7001

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.





HOMOCISTEÍNA EN ADOLESCENTES

B-Vitamins and Homocysteine in Spanish adolescents

Al-Tahan J¹, Sola R², González-Gross M^{2,3}, Ruiz JR², García-Fuentes M⁴,
Moreno L⁵, Breidenassel C¹, Castillo MJ², Pietrzik K¹.

¹Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften -
Ernährungsphysiologie. Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität.
Germany.

²Grupo Effects 262. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.
Spain

³Facultad de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte, Universidad
Politécnica de Madrid. Spain.

⁴ Dpto. Pediatría. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria.

⁵ Dpto de Fisiatria. EU Ciencias de la Salud. Universidad de Zaragoza.

Correspondence address:

Prof. Dr. Marcela Gonzalez-Gross. Facultad de CC de la Actividad Física
y del Deporte. Universidad Politécnica de Madrid/ Martín Fierro s/nE-
28040 Madrid

Tel.: +34 91 336 4039

Fax: +34 91 5497307

e-mail: marcela.gonzalez.gross@upm.es

Acknowledgements: This study has been supported by the Spanish Ministry of Health Instituto de Salud Carlos III (FIS PI021830). The AVENA study was supported by the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III (FIS 00/0015), CSD grants 05/UPB32/01 and 09/UPB31/03, 13/UPB/20/04 the Spanish Ministry of Education (AP2003-2128; AP-2004-2745), and grants from Panrico S.A., Madaus S.A. and Procter and Gamble S.A. We want to thank Ms P Carazo, Ms R Perez and Ms Teresa Amigo for their collaboration in this study.

Abstract

Background: Adolescence is characterized by a very intense growth and personal development during a relatively short period of time. Therefore, nutritional needs are higher than during other life stages. Due to their important role in cell formation B-Vitamins, in particular folate and cobalamine, are responsible for human beings' healthy growth. Additionally, they are strongly connected with the emergence of homocysteine, an independent risk factor for cardiovascular diseases. However, the B-Vitamin and homocysteine status of Spanish adolescents is not well known.

Objectives: The aim of this study is to assess the status of B-Vitamins and homocysteine in healthy Spanish adolescents for the subsequent establishment of new adolescent reference values.

Material and Methods: Serum cobalamine, serum folate, homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T variant, BMI, self-reported Tanner stage were determined in a sample of 165 Spanish adolescents (84 females, 81 males; 13-18.5 years) and analysed by gender with the Student's T-test. Interactions between socioeconomic status, age-group, methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, BMI, Tanner stage and vitamin status, respectively was examined by ANOVA (level of significance $P < 0.05$).

Results: Boys had markedly higher homocysteine mean values (males: $9.79 \pm 4.03 \mu\text{mol/L}$; females: $8.30 \pm 2.13 \mu\text{mol/L}$) whereas girls showed higher serum cobalamine values compared to the boys (males: $559.66 \pm 141.80 \text{ pmol/L}$; females: $672.15 \pm 250.85 \text{ pmol/L}$). Serum folate significantly increased with a better socioeconomic status (low: $5.76 \pm 2.23 \text{ ng/mL}$; high: $6.48 \pm 2.48 \text{ ng/mL}$). Adolescents with the homozygous variant of methylenetetrahydrofolate reductase displayed significantly higher values for homocysteine and lower values for serum folate (normal: $5.60 \pm 1.53 \text{ ng/mL}$ serum folate, $8.60 \pm 1.57 \mu\text{mol/L}$ homocysteine; homozygous: $4.45 \pm 1.39 \text{ ng/mL}$ serum folate, $11.28 \pm 3.81 \mu\text{mol/L}$ homocysteine). Between BMI, Tanner stage, age group and vitamin status no correlations were found.

Conclusions: These data reinforce findings concerning higher homocysteine and lower serum folate levels in homozygous persons. Regarding reference values for adults results remain within normal ranges. However, adolescents might be subject to other ranges than adults. Hence, to assure a better assessment of health in adolescence a revision of adolescent references would be reasonable.

Introduction

Adolescence is a crucial period of a human life and implies manifold changes in physiology and psychology. Both factors influence the adolescent's behaviour, nutritional needs, and habits. Adolescence is characterized by a very intense growth and personal development during a relatively short period of time. Therefore, nutritional needs and energy requirements are higher than during other life stages [1, 2]. Increasing evidence demonstrates that risk factors start to implement during childhood and adolescence and increase the probability of developing several diseases e. g. atherosclerosis, dyslipidaemia, negative dietary habits, obesity, diabetes, osteoporosis and certain types of cancer [3-5] during adulthood.

B-Vitamins are involved in almost all metabolic reactions e. g. protein, carbohydrate, fat, and nucleic acid metabolism. Special attention should be paid to folate and cobalamine (Cbl) because of their important role in cell formation. Both vitamins are responsible for human beings' healthy growth. Cbl deficiency may lead to severe neurological disorders, which have been described in strict vegetarians [6, 7]. Furthermore in the state of Cbl deficiency the metabolic active parts of folate accumulate in the irreversible form of 5-methyltetrahydrofolate due to several feedback mechanisms. The regeneration to tetrahydrofolate is vitamin B₁₂ dependant. Subsequently, Cbl deficiency causes a functional deficiency of folate. Homocysteine (tHcy) is a sulphur-containing amino acid formed during metabolism of methionine. This pathway uses folate as a substrate and vitamin B₁₂ as a co-factor. The other pathway is the trans-sulphuration pathway, which results in the production of cysteine and uses vitamin B₆ as a co-factor. Therefore, a lack of these vitamins leads to an increase of the tHcy level which is a risk factor for cardiovascular diseases [8].

The problem of inadequate consumption of foodstuffs in conjunction with negative nutritional habits and physical inactivity etc. increasingly affects the young population. In order to give any recommendations, an evaluation of the present day situation is required according to Kersting et al. [9]. Good and evidence-based information on nutritional requirements as well as tHcy and B-Vitamin status of healthy adolescents in Europe is sparse [10, 11]. Hence, it is necessary to gain representative and comparable data of the adolescent population. Therefore, we have assessed the folate, Cbl, and tHcy status of healthy Spanish adolescents.

Methods

Study design

This research was conducted in a sub-sample of the AVENA-Study (*Alimentación y Valoración del Estado Nutricional en Adolescentes: Feeding and Assessment of Nutritional Status of Spanish Adolescents*). The cross-sectional AVENA-Study was designed to evaluate the following parameters in a representative sample of Spanish adolescents from Granada, Madrid, Murcia, Santander, and Zaragoza (Spain) in order to identify risk factors for chronic diseases in adulthood: 1) the dietary intake, food habits and nutrition knowledge; 2) the daily physical activity and personal approach; 3) the physical condition; 4) the anthropometry and body composition; 5) the hematobiochemical study: plasma lipid phenotypic and metabolic profile, blood cell counts; 6) the genetic markers of cardiovascular risk lipid factors; 7) the immunocompetence and 8) the psychological profile. The complete and detailed methodology of the project has been described elsewhere [12].

Subjects

As it was not included in the main protocol, serum cobalamine (sCbl), serum folate, tHcy, MTHFR polymorphism and Creatinine (Crea) were available in a sub-sample of 165 adolescents aged 13 to 18.5 years. Before blood sampling, each subject was evaluated and all anamnesis data were registered and reviewed to judge the adolescent's medical status. After finishing the field study, the subjects who did not fulfil the inclusion criteria were excluded. Exclusion criteria were the following: diabetes, pregnancy, abuse of alcohol or drugs and in general, pathologies that are not directly related to nutrition.

The socioeconomic status was assessed by means of the educational level and the type of occupation of the father [Sociedad Española de Epidemiología. *La medición de la clase social en ciencias de la salud. Informe de un grupo de trabajo de la Sociedad Española de Epidemiología*. Barcelona: SG Editores, 1995.]. According to this information, adolescents were classified into five categories: low, medium-low, medium, medium-high, and high socioeconomic status.

After receiving complete information about the aims and methods of the study, all subjects and their parents or guardians signed fully informed written consent. The protocol was approved by the Review Committee for Research Involving Human Subjects of the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain).

Anthropometric methods

Subjects were barefoot and in their underwear for anthropometric measurements. Weight was measured with a Seca scale (with a precision of $\pm 100\text{g}$), height with incorporated stadiometer to the scale. Harmonization and standardization of anthropometric measurements used to assess body composition within the AVENA-Study was strictly controlled and has been previously published by Moreno et al. [13] and the AVENA group. The International Obesity Task Force (IOTF) has proposed the use of international cut-off points in children and adolescents to be used as reference standards for body mass index (BMI) and the subjects were divided into normal, overweight, and obesity, according to the IOTF criteria published by Cole et al. [14]. To achieve groups with higher numbers of subjects, the overweight and obesity groups were studied as one group. Body fat percentage was calculated by the formulas described by Slaughter et al. [15]. During anthropometrical measurements, trained interviewers asked the adolescents to classify themselves in one of the five stages of pubertal maturity defined by Tanner and Whitehouse [16]. The standard staging of pubertal maturity describes breast and pubic hair development in girls and genital and pubic hair development in boys.

Blood sampling and analytical methods

Standardized in all cities, blood samples were collected by venipuncture by a trained phlebotomist between 8:00 and 9:30 a.m. Blood for serum samples were collected in vacuainers and allowed to clot. The serum was separated by centrifugation, divided into aliquots, frozen, and stored at -80°C until withdrawn for analysis.

Biochemical data were collected by using the standard methods. Crea was detected by using the colorimetric Jaffé method with Hitachi 917 Systems. tHcy was measured by a totally automated fluorescence polarisation immunoassay (FPIA; IMx tHcy Kit, Abbot Diagnostic, Abbot Park, IL, USA). Serum FOLATE and sCbl levels were measured by using the flourometric method with an Abbot IMx auto analyser (Abbot Laboratory, Chicago, USA). Total blood DNA was extracted and purified from 500 μL of whole blood with anticoagulant EDTA, using the procedure described by Higuchi [17]. Genotyping of the 677C>T variant in the human methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene was performed by means of polymerase chain reaction and allele-specific restriction digestion of the amplified products with the restriction enzyme Hinf I (GE Healthcare), as previously described by Frosst et al. [18].

Statistical analysis

The sample was adjusted by a weight factor in order to equilibrate the sample in accordance to the distribution of the Spanish population (Source: The Spanish National Institute for Statistics) and to warrant that age and gender were representative. Median values, 2.5th and 97.5th percentile if possible, 5th and 95th percentile ranges were calculated for these variables as well as mean values and standard deviations (SD). Prior to further analysis, the data were checked for normal distribution with the use of the Kolmogorov-Smirnov-Test. The data for tHcy and sCbl were not normally distributed and therefore log transformed in order to normalize distribution for analyses. The Student's T-test was used to compare both gender with respect to the blood values of serum folate, sCbl, tHcy, MTHFR polymorphism, BMI, Crea, and the Tanner stage. Interactions between socioeconomic status, age-group, MTHFR polymorphism, BMI, Tanner stage and vitamin status, respectively was examined by ANOVA. The level of significance was set at $P < 0.05$. Statistics were performed using SPSS 13.0 for Windows XP (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

Results

The mean age \pm SD of the studied sub-group was 14.7 ± 1.4 for males and 14.5 ± 1.4 for females (not significant; n.s.). According to the pubertal maturity, the studied boys and girls (n.s.) were mainly at Tanner stage IV (39.7 %) and V (44.0 %), with smaller percentage at lower stages: I (0 %), II (3.0 %) and III (13.3 %). BMI was not significantly different between genders; however, bodyfat differed ($F = 4.25$, $P < 0.001$). Girls had an average bodyfat content of 24.2 ± 6.8 % whereas boys had 18.6 ± 8.0 %. The MTHFR polymorphism appeared equally in both genders. **Table 1** shows sCbl, serum folate, tHcy and Crea values for males and females. sCbl ($F = 1.57$, $P = 0.001$), tHcy ($F = 0.12$, $P = 0.002$), and Crea ($F = 2.23$, $P < 0.001$) values revealed significant differences between the gender groups. As depicted in **Figure 1-3**, boys had markedly higher tHcy and Crea values and girls had higher sCbl values compared to the boys.

Table 2 presents sCbl, serum folate, tHcy, and Crea values by socioeconomic status. In this table the 5th and 95th percentile was chosen, as the 2.5th and 97.5th percentiles were equivalent with minimum and maximum due to the small number of persons of each group. Serum folate significantly increased with a better socioeconomic status ($F = 3.393$, $P = 0.011$) as depicted in **Figure 4**. Other correlations could not be found.

In **Table 3** results of sCbl, serum folate, and tHcy are shown by MTHFR polymorphism. Adolescents with the homozygous variant of MTHFR displayed significantly higher values for homocysteine ($F = 7.19, P = 0.001$) and lower values for serum folate ($F = 4.57, P = 0.012$) compared with the normal group. These findings are also depicted in **Figure 5** and **6**.

Table 4 illustrates sCbl, serum folate, tHcy, and Crea by age group and gender, and complementing **Table 5** shows these results except for Crea as percentiles. Looking at the whole examined population by age group, the 15-year-olds showed the highest values for sCbl in mean and median. The lowest mean was presented by the 16-year-old age group and the 14-year-old age group presented the lowest median. For serum folate, the youngest age group revealed the highest values in mean and median, whereas the oldest age group showed the lowest results. In contrast to that, the youngest age group demonstrated the lowest values for tHcy with $8.49 \pm 2.23 \mu\text{mol/L}$. The 16-year-old had the highest mean with $9.95 \pm 3.74 \mu\text{mol/L}$ and the 17-year-old had the highest median for tHcy. Crea rose in either gender with increasing age ($F = 13.933, P < 0.05$).

The male subgroup showed similar results for serum folate, tHcy, and Crea, but not for sCbl. Results for this vitamin did not follow a trend. The 16- and 17-year-olds revealed higher values for tHcy and Crea, whereas the results for serum folate were low. The younger age groups presented high serum folate and low tHcy, and Crea values (n.s.).

The female subgroup did not demonstrate clear trends; however, some results especially for Crea were similar to the boys. 15-year-old adolescents had the highest values for sCbl, and 14-year-old the lowest values. Lowest results for serum folate were found in the 14-year-old age group. The highest mean for serum folate was found in the youngest age group with $5.92 \pm 1.99 \text{ ng/mL}$ and the highest median in the oldest age group with 5.90 ng/mL . The maximal values for tHcy were found at age 16 whereas the age group of 15-year-old showed the lowest mean for tHcy.

Neither there were significant differences of vitamin status among the obesity stages, and bodyfat, nor among the Tanner stages except for Crea. For Crea, values rose with increasing Tanner stage ($F = 4.210, P = 0.007$).

Discussion

The aim of the present study was to analyze folate, Cbl, and tHcy status in a Spanish adolescent population. Few studies investigated the tHcy and B-Vitamin status in adolescents (10). However, there were some aspects which made the comparability of these studies difficult. The investigated data were either demonstrated by different statistical means and age groups or the unit of measure varied. The majority of the studies observed a rather unrepresentative group and this might also have restricted the present study.

In Nigeria, VanderJagt et al. [19] investigated the folate and Cbl status of a female representative group (12-16 years) in a region with a high incidence of neural tube defects. Mean serum folate concentrations for the 162 girls was 6.8 ± 2.3 ng/mL (range: 2.3-13.3 ng/mL) and were higher than the found results in the AVENA-Study. Mean sCbl concentration in this population was 224 ± 81.6 pmol/L (range: 94-519 pmol/L). According to the prevailing vegetarian diet, as described in the same paper, Nigerian girls had much lower sCbl values than Spanish girls. The concentration of tHcy could be determined only for 56 of the 162 subjects. The mean tHcy concentration was 15.9 ± 5.0 μ mol/L and ranged from 8.3 to 35.6 μ mol/L. These concentrations were comparable to the results measured in Spanish boys; however, tHcy levels for girls in the AVENA-Study were much lower.

Osganian et al. [20] aimed to point out the role of tHcy as a risk factor for cardiovascular disease (CVD) in children. The 3524 US schoolchildren (13 and 14 years) of this cross-sectionally designed analysis were part of a larger study, the Child and Adolescent Trial for Cardiovascular Health (CATCH). Complete laboratory data, including values for tHcy, folate, Cbl, and vitamin B₆ were available for 3321 children. The mean tHcy concentration was 5.3 ± 1.9 μ mol/L (range: 0.1-25.7 μ mol/L) thus, lower than those found in the AVENA-Study. The mean level of folate was 18.5 ± 9.1 ng/mL (range: 3.8-143.0 ng/mL) and the mean Cbl concentration was levelled at 396.1 ± 164.6 pmol/L (range: 21-1747 pmol/L). Mean concentrations for folate and Cbl were similar to the data found in the present study though the ranges measured by Osganian et al. were much higher which might be explained by the high consumption of fortified food.

The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) (1991 – 1994) had the objective to identify reference ranges for tHcy in US residents and to measure the dimensions of the contribution of circulating vitamin concentrations to high tHcy

concentrations. In this cross-sectionally designed prevalence study 3563 males and 4523 females took part. Selhub et al. [21] presented the results as percentiles by gender and age group. Ten percent of the male participants (12-19 years) had folate concentrations of 2.5 ng/mL or less and 90 % had 10.1 ng/mL folate or less. Females of the same age group showed similar values. In the present study the 10th percentile was levelled a bit higher but the 90th percentile was levelled lower than percentiles in the Third NHANES. For Cbl the authors found 246 pmol/L and 591 pmol/L as 10th and 90th percentile for males and 235 pmol/L and 639 pmol/L for females. In the AVENA-Study 10th and 90th percentiles for vitamin B₁₂ were both higher. Additionally, some age groups revealed Cbl values double as high as measured in the NHANES. tHcy concentrations were available from 167 boys and 183 girls. In males Selhub et al. measured 4.7 µmol/L and 8.9 µmol/L tHcy, in females 3.4 µmol/L and 6.9 µmol/L tHcy. Results of the present study were higher, especially the upper percentiles. In males, the percentile values for tHcy were consistently higher than in females, though both gender showed similar ranges between the upper and lower percentile. Furthermore the ranges seemed to increase slightly with age regardless of sex. The authors discovered a negative correlation between tHcy and folate and a weaker correlation between tHcy and Cbl.

In Taiwan, Chang et al. [22] investigated the determinants and distributions of plasma tHcy levels and the relationship between tHcy, folate, and Cbl among randomly selected school children (609 boys and 625 girls; 12-15 years). Boys revealed significantly higher tHcy levels than girls ($P < 0.05$) with concentrations of 10.50 ± 4.13 µmol/L and 8.95 ± 2.61 µmol/L, respectively. Measured tHcy concentrations of both gender were higher than those established in the AVENA-Study. Additionally, boys had lower plasma folate levels (2.67 ± 1.26 ng/mL versus 2.82 ± 1.14 ng/mL) and Cbl concentrations (444.8 ± 158.4 pmol/L versus 495.0 ± 181.5 pmol/L) than girls ($P < 0.05$). Found data for folate and cobalamine were lower than the discovered concentrations in the present study. Particularly, folate concentrations were half the concentration of the Spanish adolescents.

Tonstad et al. [23] examined the relationship between tHcy, lipid, and apolipoprotein B concentrations in 678 Norwegian children (8-12 years) and premature cardiovascular disease in family members. The children showed a mean tHcy concentration of 5.25 µmol/L. In Italy, Minniti et al. [24] measured tHcy concentrations of 96 healthy children (7.5-12.5 years) to determine new paediatric reference ranges. In boys, tHcy levelled at 7.4 ± 2.15 µmol/L, while the value for girls levelled at

6.1 ± 1.18 µmol/L thus was significantly different from the boys' ($P < 0.05$). An age dependent distribution was also discovered in this study. Studies working on tHcy and several risk factors for coronary heart disease (CHD) with similar results and an even wider range of age groups were carried out by Gallistl et al. [25] and Glowinska et al. [26]. The data found in the above mentioned studies were lower than the concentrations measured in the youngest age group of the present study. These results reinforce the observation that tHcy concentrations rise with increasing age.

Another study investigated the nutritional status of socially disadvantaged schoolchildren (12-13 years) in London. Doyle et al. [27] found mean Cbl concentrations of 481 ± 210 pmol/L and 478 ± 174 pmol/L for the 34 participating boys and the 32 girls, respectively. Mean folate concentrations were 8.0 ± 3.0 ng/mL for boys and 6.2 ± 2.3 ng/mL for girls. Boys had markedly higher values for folate than girls ($P < 0.02$). The measured concentrations for Cbl did not vary in great dimensions between genders (n.s.). Values for folate were higher and values for Cbl were lower than results of the present study.

Raslova et al. [28] investigated the effect of diet and methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism on plasma tHcy in Slovakian adolescents (113 boys and 202 girls; 14 years). Mean plasma tHcy concentrations levelled at 9.4 ± 3.5 µmol/L for boys and at 8.9 ± 3.1 µmol/L for girls (range boys: 2.0-19.0; range girls: 4.0-31.0 µmol/L). Results were similar to the data measured in the AVENA-Study. It is remarkable that females showed a higher maximum than males in the study of Raslova et al., whereas in the present study it was the opposite. The boys' maximal tHcy concentration was higher than the girls'. According to previous statements, the authors did not find any sex differences, though a positive correlation of tHcy concentrations with age.

In the work done by Reddy [29], 120 healthy children up to an age of 18 years from New Orleans (US) were studied in order to set up new paediatric reference ranges for tHcy. The age group 14 to 18 years showed mean tHcy concentrations of 9.8 ± 3.8 µmol/L for boys and 9.4 ± 3.6 µmol/L for girls which are similar to the data found in the AVENA-Study. Although there appeared to be a slight trend of higher values with age, neither the differences among the four age groups were statistically significant, nor there was found a significant difference between the genders.

The National Diet and Nutrition Survey (NDNS): Young People at the age four to 18 years was conducted in mainland Britain during 1997. Bates et al. [30] described the distribution of tHcy, cysteine, and cysteinyl-glycine and compared them with values observed in British elderly from a previous NDNS. The data for tHcy were shown as geometric mean (GM) as well as 2.5th and 97.5th percentile. A value of 6.18 (2.9/11.5) $\mu\text{mol/L}$ and 6.40 (3.9/14.3) $\mu\text{mol/L}$ was found in boys and girls (11-14 years), respectively. In the age group 15 to 18 years the GM was 8.54 (4.1/20.1) $\mu\text{mol/L}$ for males and 7.80 (3.9-14.3) $\mu\text{mol/L}$ for females. Values were lower than measured in the present study, though comparing GM with arithmetic means is not a good comparison. tHcy rose with increasing age and was independent from sex. In winter tHcy was lower than in other seasons. In adolescents older than 15 years, tHcy was higher in smokers and in the younger age groups it was higher when the mother was a smoker.

In Spain, Vilaseca et al. [31] examined 195 children and adolescents (two months - 18 years) in order to establish new reference values for tHcy. The median and the 2.5th and 97.5th percentile for the whole sample was 6.3 (3.7/10.3) $\mu\text{mol/L}$. Results were independent of sex, but correlated positively with age ($P < 0.001$). Comparing the age groups of eleven- to 15-year-old (6.6 $\mu\text{mol/L}$) and 16 to 18-year-old (8.1 $\mu\text{mol/L}$) the tHcy concentration of the older age group was significantly higher ($P < 0.001$). Bjarke Mønsen et al. [32] investigated cobalamin concentrations and the association to folate and the metabolic markers in 700 healthy children in Norway. The age group of ten- to 19-year-old consisted of 213 adolescents. Differences in gender were not observed. The age group ten to 15 years showed a median and interquartile range of 436 (295-529) pmol/L sCbl, 5.2 (4.0-6.6) ng/mL serum folate, and 6.52 (5.7-7.7) $\mu\text{mol/L}$ plasma tHcy. In the age group of 15 to 19 years the following values were found, 369 (294-452) pmol/L sCbl, 4.3 (3.4-5.5) ng/mL serum folate, and 7.75 (6.6-9.1) $\mu\text{mol/L}$ tHcy. From age seven to 15 years, tHcy increased while serum folate and sCbl decreased. The results of the AVENA-Study consistently showed higher concentrations for serum cobalamin and tHcy. This might be explained by the higher number of younger children that had been included in the studies carried through by Vilaseca et al. and Bjarke Mønsen et al. However, in the similar age groups of 16 to 18 years, Cbl and tHcy concentrations remained high. Values found for folate were in accordance with results of the present study.

The Family Intervention Trial (FIT) study evaluated nutritional status, health, and cardiovascular risk factors in a large cohort of first

grade pupils, their older siblings and parents. The work, done by Rauh et al. [33], is part of this prospective intervention study. Plasma tHcy, sCbl, serum folate, Crea and serum cystatin C were measured in 257 German children from Erlangen (6-17 years). The data were shown separately for boys and girls as mean \pm SD, range, 2.5th and 97.5th percentile. The author found 5.7 ± 1.7 $\mu\text{mol/L}$ tHcy in males (range: 1.9-11.0; P: 3.1/10.5), and 5.5 ± 1.6 $\mu\text{mol/L}$ for girls, (range: 0.6-11.4; P: 2.7/9.2). Cbl concentrations for boys were 529.0 ± 180.6 pmol/L (range: 232.9-1083.1; P: 259.9/993.1), and for girls 551.5 ± 180.7 pmol/L, (range: 193.0-1219.1; P: 304.5/993.7). Folate concentrations were levelled at 11.0 ± 3.7 ng/mL, (range: 3.0-18.0; P: 3.8/17.8) for boys, and 10.5 ± 3.7 ng/mL (range: 4.3-23.8; P: 4.4/17.8) for girls. Comparing the results despite the different age groups, folate concentrations were consistently lower and sCbl values of the AVENA-Study were somewhat higher than found in the study done by Rauh et al., though the Cbl ranges were similar. tHcy concentrations also showed higher values in the AVENA-Study due to the older age of the sample. Results for tHcy in the study of Rauh et al. were independent of gender and cystatin C, but correlated positively with Crea and lean body mass ($P < 0.0001$). There was an inverse correlation ($P < 0.0001$) between tHcy and serum cobalamine as well as folate.

Conclusion

The results of the above mentioned studies varied strongly. Most values for Cbl and tHcy were levelled below those measured in the AVENA-Study, whereas most values for folate were situated above. The majority of the cited studies omitted Tanner stages, socioeconomic status and MTHFR polymorphism. Often age groups were not divided exactly into years of age which complicates comparing different age groups. Gender differences were discovered only by a few works, in contrast to the results of the present study. Also the observation that the vitamin status deteriorates and tHcy rises with increasing age could not be established. A possible reason might be the rather small sample size in each age group in comparison with other studies, although most studies examined the same sample size with an even wider age range. To exclude this restriction, a study with a higher number of adolescents would improve the representativeness.

REFERENCES

1. Duyer, J., *Nutritional requirements of adolescence*. Nutr Rev, 1981. **39**(2): p. 56-72.
2. Deheeger, M., F. Bellisle, and M.F. Rolland-Cachera, *The french longitudinal study of growth and nutrition: data in adolescent males and females*. J Hum Nutr Dietet, 2002. **15**: p. 429-438.
3. Block, G., B. Patterson, and A. Subar, *Fruits, vegetables and cancer prevention. A review of epidemiological evidence*. Nutr Cancer, 1992. **18**: p. 1-29.
4. Bouchard, C. and J.P. Despres, *Physical activity and health: atherosclerotic, metabolic, and hypertensive diseases*. Res Q Exerc Sport, 1995. **66**: p. 268-275.
5. Diplock, A.T., *Antioxidants and disease prevention*. Mol Asp Med, 1993. **15**: p. 293-376.
6. Bar-Stella, P., Y. Rakover, and D. Ratner, *Vitamin B12 and folate levels in long-term vegans*. Isr J Med Sci, 1990. **26**: p. 309-312.
7. Ashkenazi, S., et al., *Vitamin B12 deficiency due to a strictly vegetarian diet in adolescence*. Clin Pediatr (Phila), 1987. **26**: p. 662-3.
8. Bässler, K.-H., et al., *Vitamin-Lexikon*. 3. ed. 2002, München Jena: Urban & Fischer.
9. Kersting, M., U. Alexy, and W. Sichert-Hellert, *Vitamin Intake of 1- to 18-Year-Old German Children and Adolescents in the Light of Various Recommendations*. Int J Vitam Nutr Res, 2000. **70**(2): p. 48-53.
10. Al-Tahan, J., M. González-Gross, and K. Pietrzik, *B-Vitamin status in European adolescents. A review of the literature*. Nutr. Hosp., 2006. **21**(4): p. 452-65.
11. Lambert, J., et al., *Dietary intake and nutritional status of children and adolescents in Europe*. Br J Nutr, 2004. **92 Suppl. 2**: p. S147-211.
12. Gonzalez-Gross, M., et al., *Alimentacion y valoracion del estado nutricional de los adolescentes espanoles (Estudio AVENA). Evaluacion de riesgos y propuesta de intervencion. I. Descripcion metodologica del proyecto*. Nutr Hosp, 2003. **18**(1): p. 15-28.
13. Moreno, L., et al., *Harmonization of anthropometric measurements for a multicenter nutrition survey in Spanish adolescents*. Nutrition, 2003. **19**: p. 481-386.

14. Cole, T., et al., *Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey*. *BMJ*, 2002. **320**: p. 1-6.
15. Slaughter, M.H., et al., *Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth*. *Hum Biol*, 1988. **60**(5): p. 709-23.
16. Tanner, J.M. and R.H. Whitehouse, *Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity and stages of puberty*. *Arch Dis Child*, 1976. **51**: p. 170-179.
17. Higuchi, R., *Simple and rapid preparation of samples for PCR*. Erlich H editors. *PCR Technology*. Stockton Press., 1989: p. 31-37.
18. Frosst, P., et al., *A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase*. *Nat Genet*, 1995. **10**(1): p. 111-3.
19. VanderJagt, D.J., et al., *Folate and Vitamin B12 Status of Adolescent Girls in Northern Nigeria*. *J Natl Med Assoc*, 2000. **92**: p. 334-340.
20. Osganian, S.K., et al., *Distribution of and Factors Associated With Serum Homocysteine Levels in Children; Child and Adolescent Trial for Cardiovascular Health*. *JAMA*, 1999. **281**(13): p. 1189-1196.
21. Selhub, J., et al., *Serum Total Homocysteine Concentrations in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): Population Reference Ranges and Contribution of Vitamin Status to High Serum Concentrations*. *Ann Intern Med*, 1999. **131**: p. 331-339.
22. Chang, J.-B., et al., *Determinants and distributions of plasma total homocysteine concentrations among school children in Taiwan*. *European Journal of Epidemiology*, 2002. **18**: p. 33-38.
23. Tonstad, S., et al., *Relation of total homocysteine and lipid levels in children to premature cardiovascular death in male relatives*. *Pediatr Res*, 1996. **40**(1): p. 47-52.
24. Minniti, G., et al., *Plasma and serum total homocysteine concentrations in paediatric patients, evaluated by high-performance liquid chromatography with fluorescence*. *Clin Chem Lab Med*, 2000. **38**(7): p. 675-6.
25. Gallistl, S., et al., *Insulin is an independent correlate of plasma homocysteine levels in obese children and adolescents*. *Diabetes Care*, 2000. **23**(9): p. 1348-52.

26. Glowinska, B., et al., *New atherosclerosis risk factors in obese, hypertensive and diabetic children and adolescents*. *Atherosclerosis*, 2003. **167**(2): p. 275-86.
27. Doyle, W., et al., *Nutritional status of schoolchildren in an inner city area*. *Arch Dis Child*, 1994. **70**: p. 376-381.
28. Raslova, K., et al., *Effect of diet and 677 C-->T 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on plasma homocyst(e)ine concentrations in slovak adolescent population*. *Physiol Res*, 2000. **49**(6): p. 651-8.
29. Reddy, M.N., *Reference ranges for total homocysteine in children*. *Clinica Chimica Acta*, 1997. **262**: p. 153-155.
30. Bates, C.J., et al., *Correlates of plasma homocysteine, cysteine and cysteinyl-glycine in respondents in the British National Diet and Nutrition Survey of young people aged 4-18 years, and a comparison with the survey of people aged 65 years and over*. *Br J Nutr*, 2002. **87**(1): p. 71-9.
31. Vilaseca, M.A., et al., *Total homocysteine in pediatric patients*. *Clin Chem*, 1997. **43**(4): p. 690-2.
32. Bjorke Monsen, A.L., et al., *Cobalamin Status and Its Biochemical Markers Methylmalonic Acid and Homocysteine in Different Age Groups from 4 Days to 19 Years*. *Clin Chem*, 2003.
33. Rauh, M., et al., *Homocysteine concentrations in a German cohort of 500 individuals: reference ranges and determinants of plasma levels in healthy children and their parents*. *Amino Acids*, 2001. **20**(4): p. 409-18.

Table 1: Serum Cobalamine, serum folic acid, homocysteine and creatinin values by gender

Parameters are shown as mean values \pm SD, median, (2.5th and 97.5th percentile), minimum, and maximum.

Gender (n)	Serum Cobalamine in pmol/L	Serum folic acid in ng/mL *	Homocysteine in μ mol/L *	Creatinin ^a in mg/dL *
m (82)	559.66 \pm 141.80	5.40 \pm 1.82	9.79 \pm 4.03	0.99 \pm 0.11
	540.00 (268.00/946.47)	5.26 (2.10/10.94)	8.92 (5.51/22.94)	1.00 (0.79/1.25)
	247.00 - 984.00	2.00 - 11.30	5.50 - 33.47	0.77 - 1.30
f (79)	672.15 \pm 250.85	5.41 \pm 1.60	8.30 \pm 2.13	0.91 \pm 0.10
	594.82 (280.63/1559.64)	5.40 (2.90/8.69)	7.91 (5.09/13.86)	0.90 (0.71/1.16)
	230.00 - 1636.00	2.70 - 12.80	4.81 - 14.39	0.70 - 1.20

^a males: n = 81

* significant difference ($P < 0.05$)

Table 2: Serum Cobalamine, serum folic acid, homocysteine, and creatinin values by socioeconomic status

Parameters are shown as mean values \pm SD, median, (5th and 95th percentile), minimum, and maximum.

Status (n)	Serum Cobalamine in pmol/L	Serum folic acid in ng/mL *	Homocysteine in μ mol/L	Creatinin in mg/dL
Low (3)	564.91 \pm 151.09	5.76 \pm 2.23	8.07 \pm 2.01	1.00 \pm 0.07
	514.89 (448.00/777.00)	5.21 (3.90/9.00)	8.04(5.65/10.46)	1.00(0.92/1.09)
	448.00 - 777.00	3.90 - 9.00	5.65 - 10.46	0.92 - 1.09
Medium-low (35)	632.33 \pm 230.93	4.80 \pm 1.30	9.79 \pm 3.65	0.95 \pm 0.11
	597.01 (362.21/1040.85)	4.83 (2.85/6.72)	8.83 (5.96/20.62)	0.94 (0.77/1.16)
	255.00 - 1636.00	2.10 - 8.10	4.81 - 23.73	0.71 - 1.20
Medium-medium (62)	612.03 \pm 226.50	5.46 \pm 1.58	9.03 \pm 3.81	0.95 \pm 0.13
	576.00 (351.22/1082.72)	5.60 (2.90/8.50)	8.46 (5.54/14.04)	0.94 (0.75/1.19)
	268.00 - 1563.00	2.10 - 8.80	5.03 - 33.47	0.70 - 1.30
Medium-high (30)	632.57 \pm 195.49	6.16 \pm 1.99	8.90 \pm 2.28	0.96 \pm 0.11
	587.83 (417.21/1139.44)	5.72 (3.34/11.17)	8.51 (5.91/14.44)	0.95 (0.76/1.13)
	374.00 - 1311.00	2.70 - 11.30	5.87 - 14.44	0.75 - 1.15
High (8)	576.38 \pm 66.00	6.48 \pm 2.48	8.08 \pm 1.12	0.93 \pm 0.07
	586.00 (462.00/668.00)	5.94 (4.10/12.80)	8.35 (6.39/9.51)	0.91 (0.84/1.03)
	462.00 - 668.00	4.10 - 12.80	6.39 - 9.51	0.84 - 1.03

* significant difference ($P < 0.05$)

Table 3: Serum Cobalamine, serum folic acid, and homocysteine values by MTHFR polymorphism

Parameters are shown as mean values \pm SD, median, (2.5th and 97.5th) percentile, minimum, and maximum.

MTHFR Polymorphism (n)	Serum Cobalamine in pmol/L	Serum folic acid in ng/mL *	Homocysteine in μ mol/L *
normal (45)	597.24 \pm 201.05	5.60 \pm 1.53	8.60 \pm 1.57
	587.51 (252.94/1430.27)	5.50 (2.85/12.10)	8.54 (6.44/13.92)
	247.00 – 1528.00	2.60 - 12.80	6.39 - 14.39
heterozygous (64)	601.78 \pm 156.49	5.02 \pm 1.56	9.82 \pm 3.82
	585.97 (296.99/1003.39)	5.04 (2.07/9.12)	9.04 (6.41/24.38)
	230.00 – 1036.00	2.00 - 11.10	6.40 - 33.47
homozygous (23)	576.97 \pm 198.86	4.45 \pm 1.39	11.28 \pm 3.81
	532.00 (382.77/1220.01)	4.10 (2.75/7.88)	10.83 (7.00/22.82)
	360.00 – 1311.00	2.70 - 8.10	6.85 - 23.73

* significant difference ($P < 0.05$)

° 5th and 95th percentile

Table 4: Serum Cobalamine, serum folic acid, homocysteine, and creatinin by age group and gender
Parameters are shown as mean values \pm SD, median (5th and 95th percentile), minimum, and maximum.

Age	Gender (n)	Serum Cobalamine in $\mu\text{mol/L}$	Serum folic acid in ng/mL	Homocysteine in $\mu\text{mol/L}$	Creatinin* in mg/dL
13	All (45)	613.81 \pm 209.78	5.78 \pm 1.66	8.49 \pm 2.23	0.89 \pm 0.10
		581.55 (269.65/1043.88)	5.62 (3.60/8.61)	7.96 (5.57/13.45)	0.88 (0.72/1.07)
		255.00 - 1528.00	3.30 - 12.80	5.53 - 14.39	0.70 - 1.10
	m (18)	533.00 \pm 151.72	5.57 \pm 1.01	8.63 \pm 1.67	0.95 \pm 0.09
		535.00 (268.00/851.00)	5.20 (4.00/7.60)	8.07 (6.21/11.07)	0.94 (0.85/1.10)
		268.00 - 851.00	4.00 - 7.60	6.21 - 11.07	0.85 - 1.10
	f (27)	668.03 \pm 227.85	5.92 \pm 1.99	8.39 \pm 2.57	0.86 \pm 0.10
		604.12 (376.68/1362.59)	5.80 (3.45/10.98)	7.63 (5.55/14.21)	0.86 (0.71/1.06)
		255.00 - 1528.00	3.30 - 12.80	5.53 - 14.39	0.70 - 1.07
14	All (40)	594.80 \pm 226.46	5.42 \pm 1.76	9.43 \pm 4.61	0.93 \pm 0.09
		541.07 (316.72/920.72)	5.40 (2.13/8.58)	8.51 (5.50/19.89)	0.92 (0.79/1.13)
		230.00 - 1636.00	2.10 - 11.10	4.81 - 33.47	0.77 - 1.16
	m (25)	564.00 \pm 141.07	5.71 \pm 1.88	9.95 \pm 5.50	0.94 \pm 0.10
		587.81 (326.86/829.05)	5.69 (2.10/10.16)	8.71 (5.51/28.84)	0.92 (0.78/1.12)
		302.00 - 846.00	2.10 - 11.10	5.50 - 33.47	0.77 - 1.13
	f (14)	648.75 \pm 326.97	4.89 \pm 1.45	8.51 \pm 2.24	0.91 \pm 0.08
		536.43 (230.00/1636.00)	4.61 (2.90/8.60)	8.42 (4.81/12.79)	0.91 (0.79/1.16)
		230.00 - 1636.00	2.90 - 8.60	4.81 - 12.79	0.79 - 1.16
15	All (34)	645.28 \pm 234.59	5.31 \pm 1.87	8.52 \pm 2.71	0.94 \pm 0.10
		615.55 (313.26/1157.52)	5.11 (2.63/10.51)	8.03 (5.47/14.81)	0.92 (0.81/1.13)
		247.00 - 1563.00	2.00 - 11.30	5.03 - 19.85	0.81 - 1.15
	m (17)	571.71 \pm 139.66	5.50 \pm 2.28	9.32 \pm 3.31	0.99 \pm 0.11
		604.59 (247.45/776.69)	5.14 (2.01/11.29)	8.76 (5.53/19.78)	1.01 (0.81/1.15)
		247.00 - 777.00	2.00 - 11.30	5.52 - 19.85	0.81 - 1.15
	f (18)	714.28 \pm 284.76	5.14 \pm 1.43	7.78 \pm 1.80	0.89 \pm 0.06
		637.08 (384.00/1563.00)	5.15 (2.70/7.70)	7.36 (5.03/12.15)	0.90 (0.81/1.06)
		384.00 - 1563.00	2.70 - 7.70	5.03 - 12.15	0.81 - 1.06
16	All (23)	592.91 \pm 183.58	5.44 \pm 1.68	9.95 \pm 3.74	1.03 \pm 0.11
		553.30 (437.16/1236.92)	5.49 (2.39/8.95)	8.83 (6.20/22.90)	1.02 (0.83/1.29)
		427.00 - 1311.00	2.20 - 9.00	5.65 - 23.73	0.82 - 1.30
	m (11)	528.29 \pm 89.38	5.53 \pm 2.24	11.00 \pm 5.09	1.05 \pm 0.12
		498.00 (427.00/728.00)	5.75 (2.20/9.00)	9.13 (5.65/23.73)	1.03 (0.87/1.30)
		427.00 - 728.00	2.20 - 9.00	5.65 - 23.73	0.87 - 1.30
	f (12)	655.62 \pm 230.26	5.35 \pm 0.98	8.93 \pm 1.22	1.00 \pm 0.11
		587.06 (493.00/1311.00)	5.45 (4.00/7.30)	8.82 (6.91/11.72)	1.02 (0.82/1.20)
		493.00 - 1311.00	4.00 - 7.30	6.91 - 11.72	0.82 - 1.20
17-18.5	All (19)	630.42 \pm 163.62	4.60 \pm 1.29	9.52 \pm 2.50	1.07 \pm 0.08
		565.14 (475.00/984.00)	4.64 (2.90/6.50)	9.29 (6.08/14.44)	1.08 (0.94/1.24)
		475.00 - 984.00	2.90 - 6.50	6.08 - 14.44	0.94 - 1.24
	m (11)	608.50 \pm 179.11	4.08 \pm 1.04	10.80 \pm 1.97	1.11 \pm 0.07
		542.00 (475.00/984.00)	4.15 (2.90/5.60)	10.18 (9.04/14.44)	1.10 (1.03/1.24)
		475.00 - 984.00	2.90 - 5.60	9.04 - 14.44	1.03 - 1.24
	f (8)	659.29 \pm 146.99	5.27 \pm 1.32	7.83 \pm 2.14	1.02 \pm 0.06
		593.00 (536.00/954.00)	5.90 (2.90/6.50)	7.02 (6.08/12.15)	1.01 (0.94/1.13)
		536.00 - 954.00	2.90 - 6.50	6.08 - 12.15	0.94 - 1.13

*age 15: creatinin all (n = 33). male (n = 16)

Table 5: Serum cobalamine, serum folic acid, and homocysteine in percentiles

sex	age	Percentiles								
		5	10	15	25	50	75	85	90	95
Serum Cobalamine in pmol/L										
m	13	268.0	337.4	404.7	446.2	535.0	590.2	763.1	812.7	851.0
	14	326.9	360.2	372.6	474.2	587.8	653.8	718.1	759.9	829.1
	15	247.5	313.9	447.1	476.0	604.6	661.6	721.6	738.7	776.7
	16	427.0	438.0	448.3	453.9	498.0	600.7	654.7	708.1	728.0
	17	475.0	475.0	475.0	532.0	542.0	576.0	984.0	984.0	984.0
f	13	376.7	492.1	510.3	554.1	604.1	725.4	824.3	908.2	1362.6
	14	230.0	360.8	421.4	465.9	536.4	843.5	905.5	1209.1	1636.0
	15	384.0	445.3	452.9	532.3	637.1	868.3	1037.0	1101.9	1563.0
	16	493.0	505.0	523.2	533.0	587.1	621.2	968.9	1211.1	1311.0
	17	536.0	536.0	540.2	556.0	593.0	757.0	913.0	954.0	954.0
Serum Folic acid in ng/mL										
m	13	4.0	4.4	4.8	4.9	5.2	6.2	7.1	7.4	7.6
	14	2.1	2.2	4.2	4.9	5.7	6.7	7.4	8.2	10.2
	15	2.0	3.4	3.8	3.9	5.1	5.9	7.9	10.5	11.3
	16	2.2	2.4	2.7	3.8	5.7	7.5	8.8	8.9	9.0
	17	2.9	2.9	2.9	2.9	4.2	4.8	5.6	5.6	5.6
f	13	3.5	3.6	3.8	4.3	5.8	7.1	7.6	8.5	11.0
	14	2.9	3.2	3.5	3.9	4.6	5.8	6.4	7.3	8.6
	15	2.7	3.2	3.6	3.9	5.2	6.3	6.8	7.4	7.7
	16	4.0	4.0	4.1	4.5	5.4	6.0	6.5	7.1	7.3
	17	2.9	2.9	3.1	4.0	5.9	6.3	6.5	6.5	6.5
Homocysteine in $\mu\text{mol/L}$										
m	13	6.2	6.6	6.9	7.5	8.1	10.7	10.9	11.0	11.1
	14	5.5	6.3	6.9	7.5	8.7	9.6	12.1	17.3	28.8
	15	5.5	6.2	6.3	6.9	8.8	10.5	11.6	14.8	19.8
	16	5.7	6.4	7.4	8.4	9.1	12.1	20.0	22.8	23.7
	17	9.0	9.0	9.0	9.3	10.2	11.6	14.4	14.4	14.4
f	13	5.5	5.6	5.9	6.3	7.6	10.0	11.3	12.8	14.2
	14	4.8	5.7	6.2	6.9	8.4	9.8	11.7	12.4	12.8
	15	5.0	6.0	6.4	6.4	7.4	8.9	10.0	10.9	12.2
	16	6.9	7.2	7.7	8.2	8.8	9.8	10.0	11.2	11.7
	17	6.1	6.1	6.1	6.3	7.0	9.2	11.5	12.2	12.2

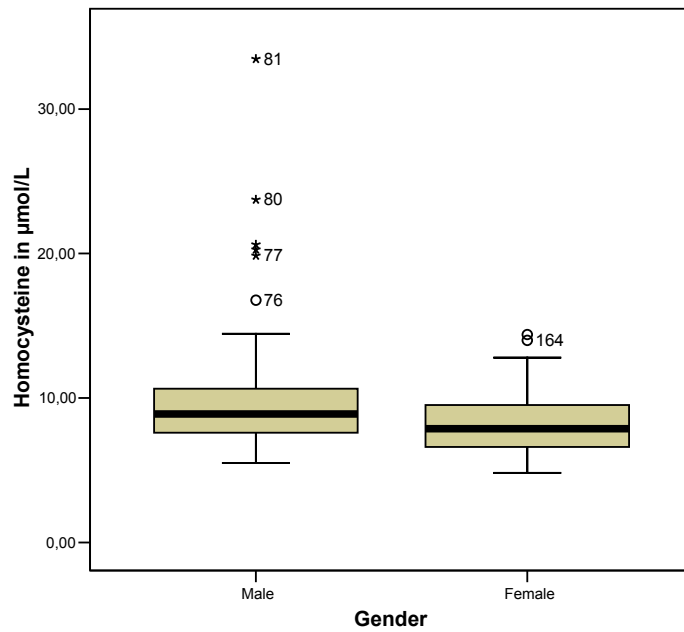


Figure 1: Distribution of homocysteine by gender

The lower and upper lines of the box correspond to the 25th and 75th percentiles, respectively. The line in the middle of the box represents the median. The error bars are situated at minimum and maximum. ° outliers; * extreme values.

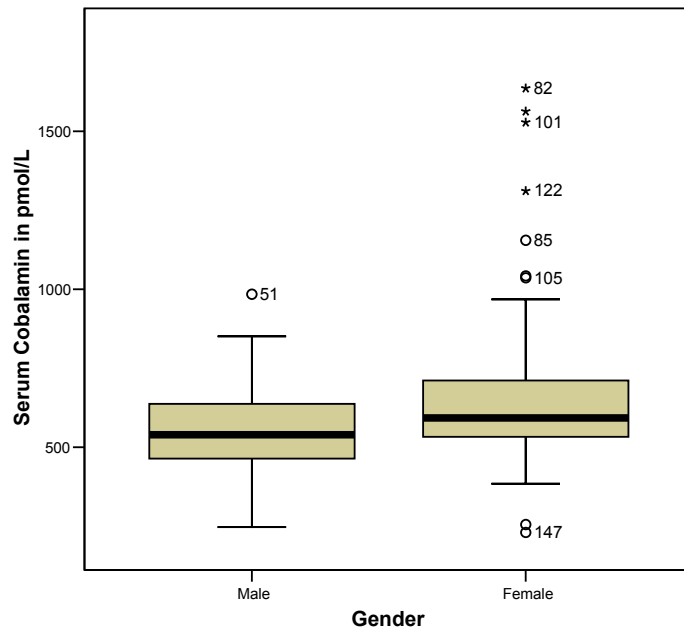


Figure 2: Distribution of serum cobalamin by gender

The lower and upper lines of the box correspond to the 25th and 75th percentiles, respectively. The line in the middle of the box represents the median. The error bars are situated at minimum and maximum. ° outliers; * extreme values.

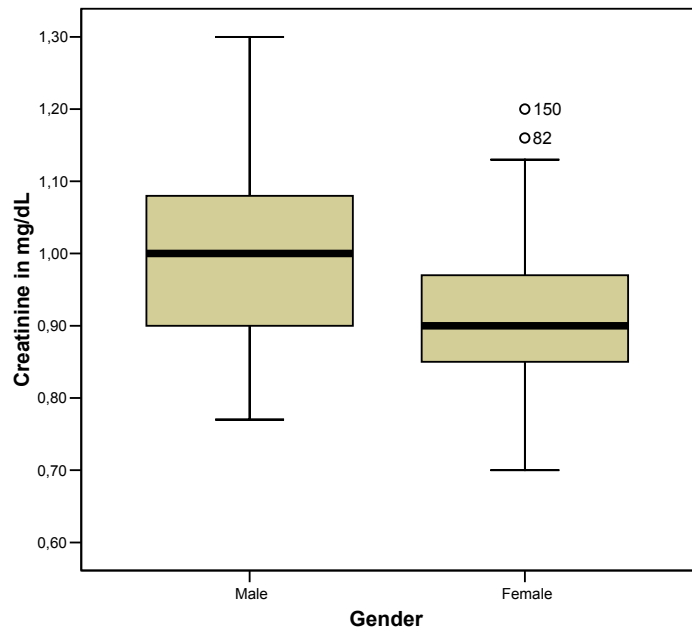


Figure 3: Distribution of creatinin by gender

The lower and upper lines of the box correspond to the 25th and 75th percentiles, respectively. The line in the middle of the box represents the median. The error bars are situated at minimum and maximum. ° outliers; * extreme values.

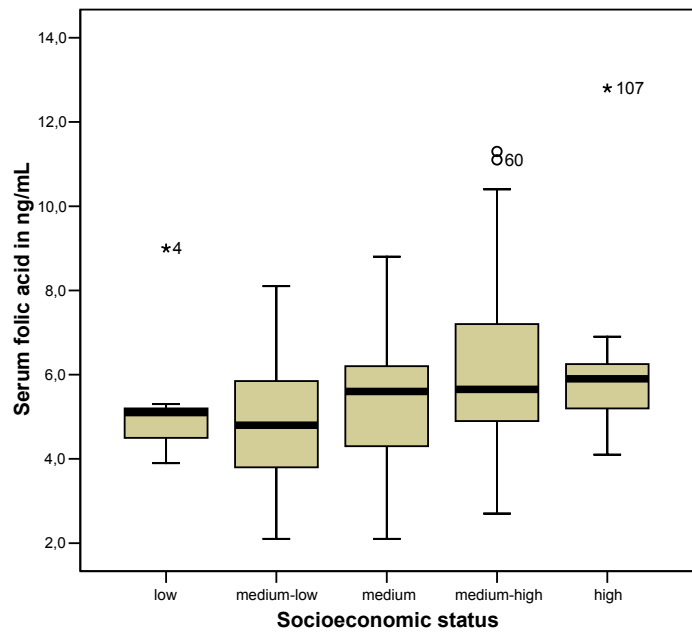


Figure 4: Distribution of serum folic acid by socioeconomic status

The lower and upper lines of the box correspond to the 25th and 75th percentiles, respectively. The line in the middle of the box represents the median. The error bars are situated at minimum and maximum. ° outliers; * extreme values.

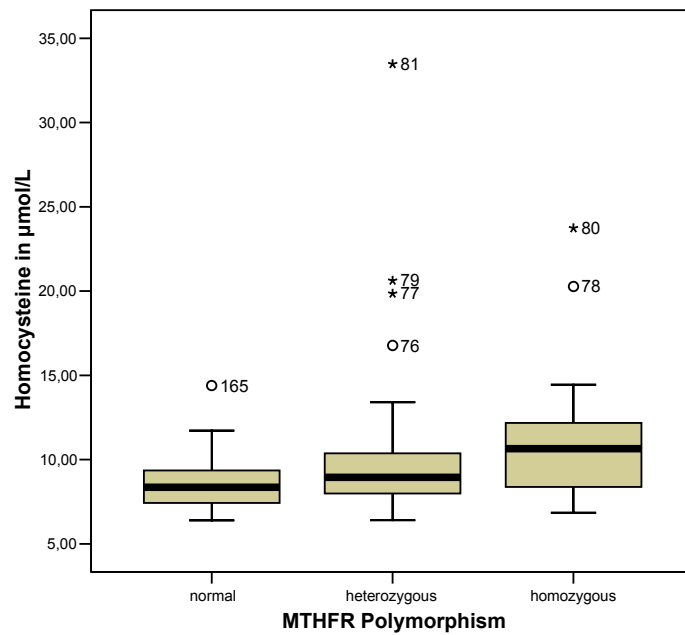


Figure 5: Distribution of homocysteine by MTHFR Polymorphism

The lower and upper lines of the box correspond to the 25th and 75th percentiles, respectively. The line in the middle of the box represents the median. The error bars are situated at minimum and maximum. ° outliers; * extreme values.

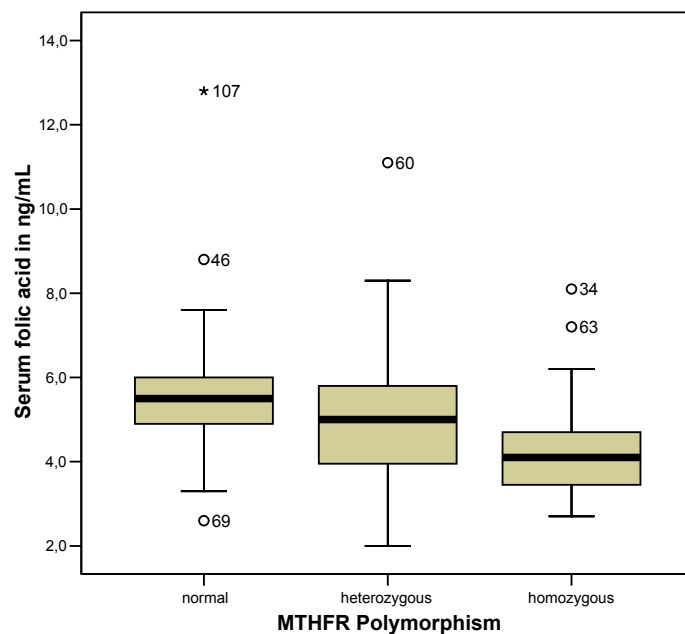


Figure 6: Distribution of serum folic acid by MTHFR Polymorphism

The lower and upper lines of the box correspond to the 25th and 75th percentiles, respectively. The line in the middle of the box represents the median. The error bars are situated at minimum and maximum. ° outliers; * extreme values.

THE AVENA STUDY

Cardiovascular fitness is negatively associated with homocysteine levels in female adolescents

Jonatan R. Ruiz, BSc; Ricardo Sola, MD, Marcela Gonzalez-Gross, PhD; Francisco B. Ortega, BSc; Vicente-Rodriguez G, PhD; Miguel Garcia-Fuentes, MD, PhD; Angel Gutierrez, MD, PhD; Michael Sjöström, MD, PhD; Klaus Pietrzik, PhD; Manuel J. Castillo MD, PhD.

Department of Medical Physiology, School of Medicine, University of Granada, 18071 Granada, Spain (Jonatan R Ruiz, Ricardo Sola, Marcela Gonzalez-Gross, Francisco B Ortega, Angel Gutierrez, and Manuel J Castillo); Unit for Preventive Nutrition, Department of Biosciences and Nutrition at NOVUM, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden (Jonatan R Ruiz, Francisco B Ortega, and Michael Sjöström); Unit of Hematology, University Hospital San Cecilio (Ricardo Sola); E. U. Ciencias de la Salud, University of Zaragoza, Spain (German Vicente-Rodriguez); School of Sport Sciences, Universidad Politécnica de Madrid. Spain (Marcela González-Gross); Department of Pediatrics, University of Cantabria, Santander, Spain (Miguel Garcia-Fuentes); and Institut fuer Ernährungswissenschaft, Abt. Pathophysiologie der Ernährung, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn, Germany (Klaus Pietrzik).

Word Count: 2625

ABSTRACT

Background: Homocysteine has been suggested to be an independent risk factor for several multi-system diseases. Low cardiovascular fitness is another important health problem. The association between cardiovascular fitness and homocysteine levels in adolescents is not known.

Objectives: To examine the association between cardiovascular fitness and homocysteine levels in adolescents.

Design: Cross-sectional study. A total of 156 Spanish adolescents (76 males, and 80 females), aged 14.8 ± 1.4 years old were studied. Cardiovascular fitness was measured by the 20 m shuttle run test. Genotyping for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T polymorphism was done by DNA sequencing. Fasting homocysteine levels was the outcome variable. Multiple regressions were used to determine the degree to which the variance in homocysteine was explained by cardiovascular fitness after controlling for age, puberty, birth weight, smoking, socioeconomic status, sum of six skinfolds, serum folate and vitamin B₁₂, and MTHFR 677C>T genotype.

Results: Cardiovascular fitness was significantly associated with homocysteine levels in female adolescents after controlling for potential confounders. Mean values of homocysteine were significantly higher in the MTHFR 677CT and TT subgroups compared to the CC subgroup in males, while in females, mean values of homocysteine were significantly higher in the TT subgroup compared to CC and CT subgroup.

Conclusions: The results suggest that cardiovascular fitness is negatively associated with homocysteine levels in female adolescents, even after controlling for MTHFR 677C>T genotype, which show an influence on homocysteine levels in both male and female adolescents.

INTRODUCTION

Homocysteine has been suggested to be an independent risk factor for several multi-system diseases,¹ including coronary heart disease,^{2,3} stroke,⁴ dementia and Alzheimer's disease,⁵ risk of hip fracture,⁶ and pregnancy complications.⁷ Moreover, elevated homocysteine levels have been associated with increased oxidative stress and endothelial damage,^{8,9} although the mechanisms are yet clarified. In children, it has been shown that elevated homocysteine levels are positively associated with cardiovascular disease in their parents,^{10,11} grandparents,^{2,13} and relatives.¹⁴

Homocysteine levels are influenced by modifiable and non-modifiable factors. Among the latter, age and gender seem to play a specific role. Levels of homocysteine are higher in boys than in girls, and this gender effect seems to be enhanced during and after puberty.¹⁵ Genetic factors also seem to affect homocysteine levels.¹⁶ The most common mutation in the European population is the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism 677C>T.¹⁷

Deficient serum levels of both folate and vitamin B₁₂ have been associated with elevated homocysteine levels in children,¹⁸ adults,¹⁹ and in the elderly.²⁰ Lifestyles factors such as smoking, lack of physical activity, excessive alcohol intake and obesity have been associated with elevated levels of homocysteine in adults.^{19,21,22}

Poor cardiovascular fitness (CVF) is another important risk factor for cardiovascular disease and it has also been shown to be a predictor of morbidity and all cause mortality.²³⁻²⁵ Kuo and colleagues²⁶ have recently described a significant negative association between CVF and homocysteine levels in adult women. Cardiovascular fitness has been negatively associated with features of the metabolic syndrome in children and adolescents,^{27,28} and with plasma lipid profile in both overweight and non-overweight adolescents.²⁹ However, studies examining the association between CVF and homocysteine levels in adolescents are lacking. For public health strategies and preventive purposes it is of interest to understand the relative influence of modifiable factors on homocysteine levels from an early age. Therefore, the aim of this study was to examine, in a dataset of Spanish adolescents, the associations of homocysteine with CVF after controlling for potential confounders.

METHODS

Participants

The studied adolescents were a subsample of the AVENA study (Alimentación y Valoración del Estado Nutricional de los Adolescentes Españoles: Food and Assessment of the Nutritional Status of Spanish Adolescents). The AVENA Study was designed to assess the health and nutritional status of adolescents. Data collection took place from 2000 to 2002 in five Spanish cities (Madrid, Murcia, Granada, Santander and Zaragoza). The present report is based on the adolescents in which both homocysteine and MTHFR genotypes were measured (n = 156, 76 males, and 80 females). The AVENA study design has been reported in detail elsewhere.³⁰⁻³²

A comprehensive verbal description of the nature and purpose of the study was given to both the adolescents and their teachers. Written consent to participate was requested from both parents and adolescents. Exclusion criteria were: no personal history of cardiovascular or metabolic disease; free of disease and medication at the time of the study; and pregnancy. The study protocol was performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1961 Declaration of Helsinki (as revised in Hong-Kong in 1989, and in Edinburgh in 2000), and approved by the Review Committee for Research Involving Human Subjects of the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain).

Before any testing was performed, the parents completed a questionnaire part of which addressed the child's previous and current health status. Socioeconomic status was also assessed via the questionnaire, and was defined by the educational level and occupation of the father. According to this information, and following the recommendation of the Spanish Society for Epidemiology,³³ the adolescents were classified into five categories: low, medium-low, medium, medium-high and high socioeconomic status.

Smoking habits at the time of the study were reported via questionnaire by the adolescents, and categorized as smoking, non-smoking, and partial smoker.

Physical examination

Height and weight were measured by standardized procedures. Body mass index (BMI) was calculated as weight/height squared (kg/m²). Skinfold thicknesses were measured with a Holtain skinfold

caliper at the biceps, triceps, subscapular, suprailiac, thigh and calf on the left side of the body to the nearest 0.2 mm.³⁴⁻³⁶ The complete set of anthropometric measurements was performed three times, but not consecutively. The anthropometric variables were measured in order and then the same measurements were repeated two more times. For calculations, mean values were obtained from the three measurements. Intra-observer reliability for skinfold thickness was higher than 95% for almost all the cases; inter-observer reliability for skinfold thickness ranged from 83.05 for biceps skinfold to 96.38 for calf skinfolds.³⁶ The sum of the six skinfold thicknesses was used as an indicator of body fat. These measures have been shown to correlate highly with dual-energy X-ray absorptiometry-measured body fat percentage in adolescents of similar ages.³⁷

Identification of pubertal development was assessed according to Tanner & Whitehouse.³⁸ Self-reported breast development in girls, and genital development in boys, was used for pubertal stage classification.

Measurement of cardiovascular fitness

Cardiovascular fitness was assessed by the 20 m shuttle run test as previously described.³⁹ Briefly, participants were required to run between two lines 20 m apart, while keeping pace. Running pace was determined by audio signals emitted from a pre-recorded cassette tape. The initial speed was 8.5 km·h⁻¹, which was increased by 0.5 km·h⁻¹ per minute (one minute equal to one stage). The tape used was calibrated over one minute. Subjects were instructed to run in a straight line, to pivot upon completing a shuttle, and to pace themselves in accordance with the audio signals. The test was finished when the subject failed to reach the end lines concurrent with the audio signals on two consecutive occasions. Otherwise, the test ended when the subject stopped because of fatigue. All measurements were carried out under standardized conditions on an indoor rubber floored gymnasium. Constant vocal encouragement was given to participants throughout the test. All participants were very well familiarized with the test, since the 20 m shuttle run test is one of the fitness tests included in the physical education curriculum in our country. Adolescents were instructed to abstain from strenuous exercise in the 48 hours preceding the test.

Cardiovascular fitness was considered as the number of stages completed (precision of 0.5 steps), where this number was converted to predict maximal oxygen consumption (VO_{2max}, mL·kg⁻¹·min⁻¹) by the Leger's equation:³⁹ $VO_{2max} = 31.025 + 3.238S - 3.248A + 0.1536SA$, where A is the age, and S the final speed ($S = 8 + 0.5 \times \text{number of stages completed}$).

Homocysteine, serum folate and vitamin B₁₂ assays

With the subject in the supine position, blood samples were taken by venipuncture after an overnight fast, using vacuum tubes (Vacutainer) and placed on ice immediately. The fasting state was verbally confirmed by the subject before blood sampling. All samples were processed within 1 h by centrifugation, divided aliquots, and portions were stored at -80°C until withdrawn for analysis.

Homocysteine in acidified citrated plasma⁴⁰ was assayed using a fluorescence polarization immunoassay on a IMx[®] unit (Abbott Laboratories, IL, USA). Serum folate and vitamin B₁₂ levels were measured using the fluourometric method with an Abbot IMx[®] autoanalyser (Abbot Laboratory, Chicago, USA).

MTHFR genotyping

Total blood DNA was extracted and purified from 500 µL of whole blood anticoagulated with EDTA, using the Quiagen procedure described by Higuchi.⁴¹ Genotyping of the 677C>T variant in the human MTHFR gene was performed by means of polimerase chain reaction and allele-specific restriction digestion of the amplified products with the restriction enzyme Hinf I (GE Healthcare), as previously described by Frosst et al.¹⁷

Statistical analysis

The data are presented as means ± SDs, unless otherwise stated. After serum folate and vitamin B₁₂ were normalized by natural logarithm transformation, all the residuals showed a satisfactory pattern.

The impact on homocysteine of gender and MTHFR 677C>T were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) since there was a significant interaction between gender and MTHFR 677C>T, and the subgroup means were compared by Tukey's test.

Following a bivariate correlation analysis, multiple regressions were used to study the relation between homocysteine and CVF after controlling for potential confounders. We used an extended-model approach: Model 1 examined the influence of CVF on homocysteine levels after controlling for age, puberty, birth weight, smoking, socioeconomic status, and sum of six skinfolds; Model 2 examined the influence of CVF on homocysteine levels after controlling for the confounders included in the Model 1 plus serum folate and vitamin B₁₂; Model 3 examined the influence of CVF on homocysteine levels after

controlling for the cofounders included in the Model 1 and Model 2 plus the MTHFR 677C>T genotype. Semipartial correlation (*sr*) was used as a measure of the relationship between CVF and homocysteine after controlling for the effect that one or more additional variables (*e.g.* age, birth weight, etc.) had on one of those variables. The analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, v. 14.0 for WINDOWS; SPSS Inc, Chicago), and the level of significance was set to = .05.

RESULTS

Data completeness and baseline characteristics

Both homocysteine and MTHFR genotype were measured in 156 adolescents (76 males, and 80 females). Of these, 77% had valid CVF data as determined by the criteria explained in the material and methods section. Pubertal development were obtained from 96%, and 94% had skinfolds thickness data. Birth weight, socioeconomic status, and smoking habit information were available for 93, 87 and 71% of the subjects, respectively.

The descriptive characteristics of the study sample are shown in Table 1. Males were significantly heavier and taller than females, and females had significantly higher skinfolds thicknesses. Males had significantly higher levels of homocysteine, lower levels of serum vitamin B₁₂, and significantly higher CVF (Table 1).

Means values of homocysteine were significantly higher in the CT and TT subgroups compared to the CC subgroup in males, while in females, mean values of homocysteine were significantly higher in the TT subgroup compared to the CC and CT subgroups (Table 2).

Bivariate associations separated by gender

In females, homocysteine was negatively associated with CVF ($r = -0.38$; $P = .022$) and with serum folate and vitamin B₁₂ ($r = -0.68$; $P < .001$, and $r = -0.40$; $P = .017$, respectively). Smoking was negatively correlated with CVF ($r = -0.32$; $P = .047$). In males, homocysteine was negatively associated with serum folate ($r = -0.62$; $P < .001$), and sum of six skinfolds negatively associated with CVF ($r = -0.64$; $P < .001$).

Relations, between homocysteine and cardiovascular fitness controlling for different confounders and separated by gender

The results of the regression models using homocysteine as the outcome variable are shown in Table 3. Variation in homocysteine levels was significantly explained by CVF in female adolescents after controlling for age, puberty, birth weight, smoking, socioeconomic status, and sum of six skinfolds (Model 1). Additional adjustments for serum folate and B₁₂ (Model 2), and MTHFR 677C>T (Model 3) further strengthened the association between homocysteine and CVF in females. No significant association was found between homocysteine and CVF in male adolescents.

DISCUSSION

The results of this study suggest that CVF is negatively associated with homocysteine levels in female adolescents, but not associated with homocysteine levels in male adolescents. The results also suggest that homocysteine levels are higher in males than in females, that serum folate and vitamin B₁₂ are negatively associated with homocysteine levels, and that MTHFR 677C>T plays an important role in homocysteine levels. There exist no other available data on the association of homocysteine levels with CVF in adolescents.

Cardiovascular fitness is a direct marker of physiological status and reflects the overall capacity of the cardiovascular and respiratory systems and the ability to carry out prolonged strenuous exercise.⁴² Theoretically, low CVF may be the consequence of pathological changes peripherally affecting the tissues and the associated vasculature or centrally perturbing coronary arteries and the heart. High CVF during childhood and adolescence has been associated with a healthier metabolic profile during these years.^{28,29} Moreover, CVF has recently been associated with arterial compliance in children aged 9-11 years, which supports the concept that CVF may exert a protective effect on the cardiovascular system from an early age.⁴³ It is biologically plausible that high CVF provides more health protection than low CVF, even in healthy adolescents as has been found in adults.²³⁻²⁵

Homocysteine is metabolized to homocysteine-thiolactone by methionyl-tRNA synthetase. Homocysteine-thiolactone acylates lysine residues of proteins, a process called protein homocysteinylolation.⁴⁴ Protein homocysteinylolation is a possible mechanism of homocysteine-related protein damage, which in conjunction with the increased oxidative stress and endothelial damage seen in subjects with elevated homocysteine levels may result in impaired CVF.⁹ However, this can not explain why the association between homocysteine and CVF exists only in female adolescents. Our findings support a previous study examining the relationship between homocysteine and CVF in adults.²⁶ Kuo et al.²⁶ which showed that high homocysteine levels were negatively associated with estimated CVF in adult women. However, they did not find any association in men, which is in concordance with our results. These results suggest sex hormones may play a role in mediating the CVF-homocysteine association, exerting different effects in females than in males; however further studies to determine whether this is the case are needed. One longitudinal study followed 499 independent community-dwelling elderly for 3 years and found that people with elevated

homocysteine levels were at an increased risk of decline in physical function.⁴⁵ However, CVF data were not provided and a gender comparison was not performed.

In the present study, CVF was objectively measured by the 20 m shuttle run test. The reliability and validity of this test has been widely documented in adolescents.⁴⁶⁻⁴⁸ We did not have a direct measure of maximal oxygen uptake, the most valid method of measuring CVF. However, from a practical point of view, field tests may be a better option than laboratory testing (especially in epidemiological studies) because a large number of subjects can be tested at the same time, which enhances the motivation of the participants, and the tests are simple, safer, and often the only feasible choice, especially in schools settings. The 20 m shuttle run test has been shown to meet these criteria. Cardiovascular fitness was considered as the number of stages completed in the 20 m shuttle run test (precision 0.5 step) for being the most direct measure obtained. However, CVF estimated from Leger's equation (VO_{2max} , ml/kg/min) was also provided for the purpose of making comparisons with other studies possible. When the analyses were performed using VO_{2max} , or speed (km/hr) instead of the number of stages as the measurement of CVF, similar results were obtained (data not shown).

The results from the present study should be interpreted with caution due to the limitations of the cross-sectional design, i.e., direction of causality can not be determined. Elevated homocysteine levels may be simply a marker of an unhealthy lifestyle that is associated with poor exercise capacity. The relationship between levels of homocysteine and CVF should be studied prospectively. It must be borne in mind is that the subjects involved in this study were healthy adolescents with no previously diagnose cardiovascular pathologies. Also, our study included a moderate number of participants. However, we believe that covariates that may confound the measures of association in our study were appropriately considered and controlled.

In conclusion, the results of this study suggest that CVF is negatively associated with homocysteine levels in female adolescents, even after controlling the MTHFR 677C>T genotype, which shows an influence on homocysteine levels in both male and female adolescents. These results should stimulate a debate on whether the metabolism of homocysteine could be one way in which the benefits of high CVF are exerted, at least in females.

Correspondence: Jonatan R. Ruiz, BSc, Department of Medical Physiology, School of Medicine, University of Granada, 18071 Granada, Spain. Tel: +34 958 243 540, Fax: +34 958 249 015. E-mail: ruizj@ugr.es

Funding/support: This study was supported by the Spanish Ministry of Health Instituto de Salud Carlos III (FIS PI021830). The AVENA study was funded by the Spanish Ministry of Health, FEDER-FSE funds FIS n° 00/0015, CSD grants 05/UPB32/0, 109/UPB31/03 and 13/UPB20/04, the Spanish Ministry of Education (AP2003-2128; AP-2004-2745), and scholarships from Panrico S.A., Madaus S.A. and Procter and Gamble S.A.

Acknowledgement: The authors thank Prof. Olle Carlsson from the Unit for Preventive Nutrition, Department of Biosciences and Nutrition at NOVUM, Karolinska Institutet, for statistical assistance.

Further information: MCG, MGG, AGS, MGF, contributed to the concept and study design. JRR, RS, MGG, FOP, AGS, MCG performed the data collection. JRR, RS, MGG, MCG conceived the hypothesis, and JRR conducted the statistical analyses and drafted the manuscript. All authors contributed to the interpretation and discussion of the results, and critically revised the drafted manuscript.

Conflict of interest: None of the authors had any conflict of interest. No benefits in any form have been received or will be received from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this article.

REFERENCES

1. Virtanen JK, Voutilainen S, Alfthan G, Korhonen MJ, Rissanen TH, Mursu J, et al. Homocysteine as a risk factor for CVD mortality in men with other CVD risk factors: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) Study. *J Int Med.* 2005; 257: 255-262.
2. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA.* 2002; 288: 2015-2022.
3. Vrentzos GE, Papadakis JA, Malliaraki N, et al. Diet, serum homocysteine levels and ischaemic heart disease in a Mediterranean population. *Br J Nutr.* 2004; 91: 1013-1019.
4. Ford ES, Smith SJ, Stroup DF, Steinberg KK, Mueller PW, Thacker SB. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a systematic review of the evidence with special emphasis on case-control studies and nested case-control studies. *Int J Epidemiol.* 2002; 31: 59-70.
5. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2002; 346: 476-483.
6. McLean RR, Jacques PF, Selhub J et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2042-2049.
7. Hague WM. Homocysteine and pregnancy. Best Practice. *Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003; 17: 459-469.
8. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest.* 1996; 98: 5-7.
9. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 1998; 338: 1042-1050.
10. Greenlund KJ, Srinivasan SR, Xu JH, et al. Plasma homocysteine distribution and its association with parental history of coronary artery disease in black and white children: the Bogalusa Heart Study. *Circulation.* 1999; 99: 2144-2149.
11. Kark JD, Sinnreich R, Rosenberg IH, Jacques PF, Selhub J. Plasma homocysteine and parental myocardial infarction in young adults in Jerusalem. *Circulation.* 2002; 105: 2725-2729.

12. Hyaneek J, Stribrny J, Sebesta P, et al. Diagnostic significance of mild hyperhomocysteinemia in a population of children with parents or grandparents who have peripheral or coronary artery disease. *Cas Lek Cesk.* 1999; 138: 333-336.
13. Morrison JA, Jacobsen DW, Sprecher DL, Robinson K, Khoury P, Daniels SR. Serum glutathione in adolescent males predicts parental coronary heart disease. *Circulation.* 1999; 100: 2244-2247.
14. Tonstad S, Refsum H, Sivertsen M, Christophersen B, Ose L, Ueland PM. Relation of total homocysteine and lipid levels in children to premature cardiovascular death in male relatives. *Pediatr Res.* 1996; 40: 47-52.
15. De Laet C, Wautrecht JC, Brasseur D, et al. Plasma homocysteine concentration in a Belgian school-age population. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69: 968-672.
16. Gonzalez-Gross M, Marcos A, Pietrzik K. Nutrition and cognitive impairment in the elderly. *Br J Nutr.* 2001; 86: 313-321.
17. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995; 10: 111-113.
18. Papoutsakis C, Yiannakouris N, Manios Y, et al. Plasma homocysteine levels in Greek children are influenced by an interaction between the methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and folate status. *J Nutr.* 2005; 135: 383-388.
19. Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73: 613-621.
20. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA.* 1993; 270: 2693-2698.
21. Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67: 263-270.

22. Silaste ML, Rantala M, Alfthan G, Aro A & Kesaniemi YA. Plasma homocysteine concentration is decreased by dietary intervention. *Br J Nutr.* 2003 89: 295-301.
23. Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med.* 2002; 346: 793-801.
24. Carnethon MR, Gidding SS, Nehgme R, Sidney S, Jacobs DR, Liu K. Cardiorespiratory fitness in young adulthood and the development of cardiovascular disease risk factors. *JAMA.* 2003; 290: 3092-3100.
25. LaMonte MJ, Barlow CE, Jurca R, Kampert JB, Church TS, Blair SN. Cardiorespiratory fitness is inversely associated with the incidence of metabolic syndrome: a prospective study of men and women. *Circulation.* 2005; 26: 505-512.
26. Kuo HK, Yen CJ, Bean JF. Levels of homocysteine are inversely associated with cardiovascular fitness in women, but not in men: data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *J Intern Med.* 2005; 258: 328-335.
27. Mesa JL, Ortega FB, Ruiz JR, Castillo MJ, Hurtig Wennl6f A, Guti6rrez A. The importance of cardiorespiratory fitness for healthy metabolic traits in children and adolescents. The AVENA Study. *J Public Health.* 2006; 14: 178-180.
28. Ruiz JR, Ortega FB, Meusel D, Harro M, Oja P, Sj6str6m M. Cardiorespiratory fitness is associated with features of metabolic risk factors in children. Should cardiorespiratory fitness be assessed in a European health monitoring system? The European Youth Heart Study. *J Public Health.* 2006; 14: 94-102.
29. Mesa JL, Ruiz JR, Ortega FB, Warnberg J, Gonzalez-Lamuno D, Moreno LA, Gutierrez A, Castillo MJ. Aerobic physical fitness in relation to blood lipids and fasting glycaemia in adolescents: Influence of weight status. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006; 16: 285-293.
30. Gonzalez-Gross M, Castillo MJ, Moreno L, et al. [Feeding and assessment of nutritional status of spanish adolescents (AVENA study). Evaluation of risks and interventional proposal. I. Methodology]. *Nutr Hosp.* 2003; 18: 15-28.

31. Moreno LA, MI Mesana, Fleta J, et al. Overweight, obesity and body fat composition in Spanish adolescents. The AVENA Study. *Ann Nut Metab.* 2005; 49: 71-76.
32. Ruiz JR, FB Ortega, LA Moreno, et al. Serum lipid and lipoprotein reference values of Spanish adolescents; The AVENA study. *Soz PraventivMed.* 2006; 51: 99-109.
33. Sociedad Española de Epidemiología. La medición de la clase social en Ciencias de la Salud. Informe de un grupo de trabajo de la Sociedad Española de Epidemiología. Barcelona: SG Editores, 1995.
34. Moreno LA, Rodríguez G, Guillén J, Rabanaque MJ, León JF, Ariño A. Anthropometric measurements in both sides of the body in the assessment of nutritional status in prepubertal children. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56: 1208-1215.
35. Moreno LA, Mesana MI, González-Gross M, et al. Anthropometric body fat composition reference values in Spanish adolescents. The AVENA Study. *Eur J Clinical Nutr.* 2006; 60: 191-196.
36. Moreno LA, Joyanes M, Mesana MI, et al. Harmonization of anthropometric measurements for a multicenter nutrition survey in Spanish adolescents. *Nutrition.* 2003; 19: 481-486.
37. Rodriguez G, Moreno LA, Blay MG, et al. Body fat measurement in adolescents: comparison of skinfold thickness equations with dual-energy X-ray absorptiometry. *Eur J Clin Nutr.* 2005; 27: 1-9.
38. Tanner JM, Whitehouse RH. Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity and stages of puberty. *Arch Dis Child.* 1976; 51: 170-179.
39. Léger LA, Lambert A, Goulet A, Rowan C, Dinelle Y. Capacity aerobic des Québécois de 6 a 17 ans – test Navette de 20 metres avec paliers de 1 minute. *Can J Appl Sport Sci.* 1984; 9: 64-69.
40. Willems HP, Bos GM, Gerrits WB, den Heijer M, Vloet S, Blom HJ. Acidic citrate stabilizes blood samples for assay of total homocysteine. *Clin Chem.* 1998; 44: 342-345.
41. Higuchi R. "Simple and rapid preparation of samples for PCR. En: Erlich H editores. PCR Technology. Stockton Press 1989: 31-37.

42. Taylor HL, Buskirk E, Henschel A. Maximal oxygen uptake as an objective measure of cardiorespiratory performance. *J Appl Physiol.* 1995; 8: 73-80.
43. Reed KE, Warburton DE, Lewanczuk RZ, et al. Arterial compliance in young children: the role of aerobic fitness. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2005; 12: 492-497.
44. Jakubowski H. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr.* 2000; 130: 377S-381S.
45. Kado DM, Bucur A, Selhub J, Rowe JW, Seeman T. Homocysteine levels and decline in physical function: MacArthur. Studies of Successful Aging. *Am J Med.* 2002; 113: 537-542.
46. van Mechelen W, Hlobil H, Kemper HC. Validation of two running tests as estimates of maximal aerobic power in children. *Eur J Appl Physiol.* 1986; 55: 503-506.
47. Léger LA, Mercier D, Gadoury C, Lambert J. The multistage 20 metre shuttle run test for aerobic fitness. *J Sports Sci.* 1988; 6: 93-101.
48. Liu NYS, Plowman SA, Looney MA. The reliability and validity of the 20-meter shuttle test in American students 12 to 15 years old. *Res Q Exerc Sport.* 1992; 63: 360-365.

Table 1. Descriptive characteristics of the subjects^a

	All (n = 156)	Males (n = 76)	Females (n = 80)
Age (y)	14.8 ± 1.4	15.1 ± 1.4	14.6 ± 1.4
Tanner (1/2/3/4/5) (%)	0/2/14/42/42	0/2/22/27/49	0/3/6/56/35
Weight (kg)	58.6 ± 12.8	61.8 ± 14.0	55.3 ± 10.5 ^b
Height (cm)	165.4 ± 8.5	170.1 ± 7.5	160.8 ± 6.6 ^c
Body mass index (kg/m ²)	21.3 ± 3.6	21.2 ± 3.7	21.3 ± 3.5
Sum of six skinfolds (mm)	82.1 ± 32.8	71.8 ± 29.5	92.9 ± 32.8 ^b
Birth weight (kg)	3.3 ± 0.5	3.3 ± 0.6	3.3 ± 0.5
Homocysteine (μmol·L ⁻¹) ^d	9.2 ± 3.4	10.0 ± 4.1	8.4 ± 2.2 ^b
Serum vitamin B ₁₂ (pmol·L ⁻¹) ^d	612.9 ± 208.8	558.0 ± 143.1	667.7 ± 247.2 ^b
Serum folate (ng·mL ⁻¹)	5.4 ± 1.7	5.3 ± 1.7	5.4 ± 1.6
Cardiovascular fitness (steps)	5.8 ± 2.8	7.5 ± 2.3	3.8 ± 1.8 ^b
Cardiovascular fitness (km·hr ⁻¹)	10.9 ± 1.4	11.8 ± 1.2	9.9 ± 0.9 ^b
Cardiovascular fitness (mL·kg ⁻¹ ·min ⁻¹) ^e	42.6 ± 7.9	47.5 ± 6.5	37.1 ± 5.4 ^b
Smoking (%)			
No	83	80	87
Yes	10	12	7
Partial smoker	7	8	6
Socioeconomic status (%)			
Low	3	5	0
Medium-low	26	28	25
Medium	46	49	44
Medium-high	18	16	21
High	7	2	10

^a Unless otherwise indicated, data are expressed as mean ± SD.

^{b,c} Sex differences were conducted by one way analyses of variance. ^b*P* < .01, ^c*P* < .001.

^d Natural log-transformed values were used in the analysis, but nontransformed values are presented in the table.

^e Estimated from Leger's equation.³

Table 2. Homocysteine levels according to methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T genotype and gender group^a.

	MTHFR 677C>T genotype			P value ^b
	CC	CT	TT	
Males (n=76)				
Homocysteine ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	8.3±1.4	11.1±5.4*	12.8±5.5*	.003
n (%)	35 (46)	31 (41)	10 (13)	
Females (n=80)				
Homocysteine ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	7.5±2.3	8.3±1.7	10.2±2.2**	.001
n (%)	26 (33)	41 (51)	13 (16)	

^aUnless otherwise indicated, data are expressed as mean ± SD.

^bP-values for the MTHFR 677C>T genotype factor.

*Significantly different from CC (CT vs CC, $P = .01$; TT vs CC, $P = .003$) by Tukey's test.

**Significantly different from CC ($P < .001$), and CT ($P = .022$) by Tukey's test.

Table 3. Standardized multiple regression coefficients (β), confidence interval (95% CI), standardized coefficient of determination (R^2), and semipartial correlation (sr) examining the association of CVF with homocysteine^a.

Model	Homocysteine ^b					
	β	95% CI	P value	R^2	sr	
<i>Males</i>						
Model 1	0.127	-0.055	0.088	.638	0.100	0.086
Model 2	0.135	-0.035	0.070	.498	0.406	0.091
Model 3	0.119	-0.032	0.063	.511	0.507	0.080
<i>Females</i>						
Model 1	-0.404	-0.131	0.001	.050	0.160	-0.360
Model 2	-0.402	-0.108	-0.021	.006	0.637	-0.358
Model 3	-0.395	-0.107	-0.020	.007	0.651	-0.351

^a Controlled confounders: Model 1 = age, puberty, birth weight, smoking, socioeconomic status, and sum of six skinfolds; Model 2 = model 1 plus serum folate, serum vitamin B₁₂; Model 3 = model 2 plus MTHFR 677C>T genotype.

^b Homocysteine values were natural log-transformed.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSION:

La hiperhomocisteinemia que se produce ante el déficit de cualquiera de las vitaminas B estudiadas en esta tesis, está relacionada con el del aumento de riesgo de enfermedad cardiovascular, aumento de la aterosclerosis y otras enfermedades relacionadas con la hiperhomocisteinemia. Pero hay otras enfermedades propias de cada estado deficitario, no debemos olvidar la patología del tubo neural que acaece en niños nacidos de madres con déficit clínico o subclínico de folato.

La enfermedad cardiovascular (ECV), representa, la primera causa de muerte en los países desarrollados originando en España aproximadamente el 40% de todas las muertes. El descubrimiento de que la ECV va precedida de los llamados factores de riesgo cardiovasculares (FRCV) y haciendo de su presencia en los individuos portadores de estos una mayor probabilidad de desarrollar patologías cardiovasculares, hace de su detección y prevención la principal estrategia a seguir en este tipo de pacientes. Los FRCV se clasifican en diferentes grupos: *principales o causales* (hipertensión arterial, diabetes mellitas, aumento del colesterol total, aumento del LDL-c, disminución del HDL-c, tabaquismo y edad) que constituyen la base de la valoración global del riesgo cardiovascular; *predisponentes* (obesidad, inactividad física, historia familiar de cardiopatía coronaria prematura, sexo masculino, resistencia a la insulina, factores étnicos y psicosociales) que contribuyen al desarrollo de los causales y de los *condicionales* (aumento de los triglicéridos séricos, aumento de las partículas LDL pequeñas y densas, lipoproteína (a), homocisteína, fibrinógeno, inhibidor del activador del plasminógeno 1 o PAI-I, factor de von Willebrand, factor V Leiden, activador tisular del plasminógeno, antitrombina III, proteína C reactiva e infección por chlamydia pneumonial).

Además de estos FRCV está la enfermedad aterosclerótica que radica en la acumulación progresiva de placas ateroscleróticas coronarias que aumentan con la edad y cuyo número varía ampliamente en los individuos. Aunque la edad es una poderosa predictora de coronariopatía crónica (CPC) en la población, hay un creciente interés en la valoración de la carga individual de estas placas mediante métodos no invasivos para estimar el riesgo. El RCV expresa la probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular en un determinado periodo de tiempo,

generalmente 5 o 10 años, incluyéndose en éste concepto la posibilidad de desarrollar las enfermedades ateroscleróticas más importantes: cardiopatía isquémica, enfermedad cardiovascular y arteriopatía periférica. La valoración global del riesgo cardiovascular es la estimación del riesgo absoluto basada en la sumación de los riesgos proporcionados por cada uno de los factores. El cálculo del riesgo absoluto permite la identificación de individuos de alto riesgo para su precoz intervención.

De todo esto deducimos la importancia que puede tener la prevención de los estados deficitarios, diagnóstico del déficit y tratamiento oportuno tanto del déficit clínico como del subclínico.

En cuanto al **diagnóstico**, hemos comprobado que el déficit de folato es fácilmente diagnosticable, con los parámetros utilizados en la práctica clínica (folato sérico e intraeritroctario), y que la homocisteína ayuda en el diagnóstico, recordemos la estrecha correlación folatos-homocisteína. Ahora bien, como en los niveles de folato influyen causas genéticas como la mutación C677T de la MTHFR, esta será determinada cuando no encontremos otra causa que justifique el estado deficitario.

No ocurre igual con la vitamina B₁₂, la cobalamina sérica se ha mostrado tanto en la literatura como en esta tesis, un parámetro poco eficaz y la homocisteína influye poco en la vitamina B₁₂, solo aumenta cuando el déficit está plenamente establecido. Es la introducción de la Holo-TC II la que nos ayudará precozmente al diagnóstico incluso del déficit subclínico, déficit que más nos interesa desde el punto de vista preventivo.

En cuanto a la **prevención**, en primer lugar recomendar al paciente el cambio en los hábitos de vida que influyen en el déficit vitamínico e hiperhomocisteinemia (alimentación, alcohol, tabaquismo, etc), sería oportuno recomendar en grupos de riesgo la suplementación vitamínica, teniendo en cuenta que la suplementación aislada con folato, como está establecida en algunos países de nuestro entorno, puede provocar un efecto negativo sobre el déficit de B₁₂ al enmascarar las alteraciones morfológicas hematológicas de los hematíes (macrocitosis), mientras el déficit prosigue y tarde o temprano llegan las alteraciones neurológicas que llegan a ser irreversibles. Por tanto es recomendable en poblaciones de riesgo la suplementación mixta Folato-B₁₂.

Como hemos visto el tratamiento oral es igual de eficaz que el parenteral, dejando este último cuando los problemas gástricos o

intestinales impidan el primero o cuando el tratamiento sea urgente como ocurre cuando hay establecidas manifestaciones neurológicas en los déficits de B₁₂.

RESUMEN

Resumen del proyecto

La deficiencia de B₁₂ representa un importante problema de Salud Pública objeto de creciente atención. Afecta especialmente al colectivo de personas ancianas y se ha relacionado con patologías de gran incidencia y gravedad que, además, tienen gran coste socio-económico como son enfermedad aterosclerótica (cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular), trastornos cognitivos, demencias, entre ellas, la enfermedad de Alzheimer, e incluso ciertos tipos de cáncer.

También se han identificado mecanismos que implican una menor absorción de B₁₂ y que están ligados a la ingesta de ciertos fármacos y al envejecimiento. El diagnóstico precoz del déficit de B₁₂ resulta muy complejo como lo es también realizar el estadiaje evolutivo de la carencia. Esto es especialmente importante porque una carencia instaurada produce lesiones irreversibles, en particular a nivel del Sistema Nervioso. En contraste con la dificultad del diagnóstico precoz, el tratamiento es sencillo y altamente coste-efectivo, pudiendo incluso ser de carácter preventivo y dirigido tanto a la población general como a la población de riesgo. El objeto del presente proyecto es, precisamente, establecer la secuencia específica de manifestaciones que acompañan al déficit de B₁₂ y comprobar la eficiencia de un protocolo diagnóstico fiable para detectar precozmente el déficit de B₁₂. El estudio se ha realizado en población de riesgo (ancianos institucionalizados). Se ha incluido la medida de holotranscobalamina, lo que resulta de absoluta novedad.

Asimismo, se ha contado con la colaboración de la Universidad de Bonn y la empresa I+D AXIS que ha desarrollado el RIA de holotranscobalamina.

Hemos podido confirmar la elevada prevalencia de deficiencia de folato, vitamina B₆ y vitamina B₁₂ en ancianos institucionalizados. Esta elevada prevalencia debe ser confirmada en estudios posteriores y en otras poblaciones, ya que de confirmarse, exige la toma de medidas de salud pública urgentes. Los niveles deficitarios de vitaminas del grupo B están asociados con niveles elevados de homocisteína, en especial la deficiencia de folato, con el consiguiente riesgo mencionado en el párrafo anterior.

Asimismo, hemos observado que tanto los niveles séricos de cobalamina como de homocisteína no sirven para detectar deficiencias subclínicas de las vitaminas analizadas. Por tanto, la medida de la holo-transcobalamina se presenta como un método alternativo interesante. Aunque en vista de los datos analizados, todo parece indicar que ningún parámetro por si mismo puede diagnosticar el

déficit de vitamina B₁₂. Mediante el método diagnóstico propuesto se pretende facilitar el trabajo en el laboratorio de análisis clínico de rutina, analizando aquellos parámetros (holo-transcobalamina y ácido metil-malónico) que mejor parecen identificar a los sujetos de riesgo. No obstante, cuando la medida del ácido metil-malónico no sea posible, el esquema diagnóstico 4 identifica a un porcentaje muy elevado de la población deficitaria.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

HOLO-TRANSCOBALAMIN AS AN EARLY INDICATOR OF VITAMIN B₁₂ DEFICIENCY IN A GROUP OF INSTITUTIONALIZED ELDERLY SPANISH PEOPLE*.



M Gonzalez-Gross (1,2), R Sola (1,3), V Lemmen (1,2), D Janke (2), MJ Castillo (1), K Pietrzik (2).

(1) Dpt. Physiology. School of Medicine. University of Granada. Spain. (2) Dpt. Pathophysiology of Human Nutrition. Institute of Nutrition. University of Bonn. Germany. (3) Haematology Service, Clinical University Hospital, Granada, Spain.
mggross@canal21.com

BACKGROUND

Vitamin B₁₂ deficiency represents an important public health problem. It especially affects the elderly and has been related to chronic degenerative diseases like coronary heart disease, cognitive impairment and dementia. Data about the real vitamin B₁₂ status of the Spanish elderly population are scarce. Early diagnosis of vitamin B₁₂ deficiency is essential, because despite of these sub clinical manifestations, neuropathy can be irreversible. In this setting the use of markers like Holo-transcobalamin (Holo-TC) and methylmalonic acid (MMA) for functional vitamin B₁₂ deficiency can be more adequate than serum B12, as has been published in several studies in the literature.

OBJECTIVE

The aim of the study was to establish the B₁₂ status of the Spanish elderly population, and to assess the frequency and severity of vitamin B12 deficiency by different biochemical, functional and morphological markers in a representative elderly population living in an elderly home institution in the south of Spain.

MATERIAL AND METHODS

This study is part of a larger cross-sectional study that aims to establish the vitamin B status of Spanish elderly, specifically B₆, B₁₂ and folate, and that has been supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria of the Spanish Ministry of Health. One-hundred and nineteen elderly aged 60 – 90 years, living in the Elderly's Home "La Milagrosa", in Armilla (Granada), Spain, were recruited for the study. After presentation of the study protocol, written informed consent was obtained from interested subjects. All residents took part in the study, the data shown are for 66% of all elderly living at the Residence. The study was approved by the Human Research Review Committee of the Universidad of Granada, School of Medicine. The study has been performed following the ethic norms of the Declaration of Helsinki 1996 (revision of Edinburgh 2000), Convention of Oviedo, the Good Clinical Practice of the CEE (document 111/3976/88 July 1990) and the Spanish legislation about clinical research in humans (Real Decreto 561/1993 sobre ensayos clínicos). After an overnight fast, blood samples were drawn between 8:00 and 10:00 h in the morning without stasis via venipuncture of the antecubital vein. Blood was distributed as follows: 4 ml in a vacutainer with EDTA for hematology, hypersegmentation of Polymorph Nuclear Neutrophils (PNN), and red blood cell (RBC) folate (Abbott, IMX). Eight ml in a vacutainer with gel and centrifuged within one hour. Serum was collected in 2 eppendorfs and immediately analyzed for serum B12, folate, total homocysteine (Hcy) (IMX, Abbott) and Holotranscobalamin (Holo-TC) (Axis-Shield). Methylmalonic acid (MMA) was sent to the laboratory at the University of Bonn always frozen by specialised Courier and analysed by GC-MS.

RESULTS

Biochemical parameters (like Holo-TC and MMA) are much more sensitive and specific as morphological alterations (megaloblastic anemia, macrocytosis, PNN), which additionally are influenced by folate status. In all cases with low serum B12 levels, the functional parameters (Holo-TC, MMA) indicated deficiency as well but to a greater extend.

Figure 1. Prevalence of vitamin B12-deficiency in institutionalized elderly measured by different parameters

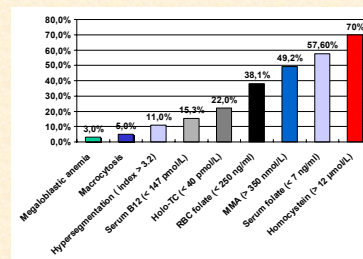


Table 1. Vitamin status in institutionalized elderly

Parameter	Mean (SD)	95-Ref
Serum B12 (pmol/L)	140.2 (129.8)	20.12
Holo-TC (pmol/L)	19.23 (21.6)	27.24
MMA (nmol/L)	112.12 (206.6)	217
Hcy (umol/L)	11.11 (20.46)	14.92
Serum folate (ng/ml)	7.17 (1.55)	6.48
RBC folate (ng/ml)	140.6 (196.8)	175
Homocysteine (umol/L)	12.1 (20.2)	17.9

CONCLUSIONS

Prevalency of B vitamin (folate and B₁₂) in Spanish elderly is high. Serum cobalamin as a classical marker for vitamin B₁₂ deficiency may lead to underestimation of the problem. Functional markers like Holo-TC and MMA might be more useful for early detection of vitamin B₁₂ deficiency. Discrepancies between the different markers might be related to impairment of renal function and indicate the need for further investigation.

REFERENCES

- Herzlich B, Herbert V. Depletion of serum holotranscobalamin II. An early sign of negative vitamin B₁₂ balance. Lab Invest 1988;58:332-337.
- Nexo E, Christensen AL, Hvas AM, Petersen TE, Fedosov SN. Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B₁₂ deficiency. Clin Chem 2002;48:561-562.
- Wickramasinghe SN, Fida S. Correlations between holo-transcobalamin II, holo-haptocorrin, and total B₁₂ in serum samples from healthy subjects and patients. J Clin Pathol 1993;46:537-539.

* Project granted by the Spanish Ministry of Health (FIS PI021830) and Axis-Shield (Oslo, Norway).

PATTERN OF MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL MARKERS IN VITAMIN B12 DEFICIENCY *



R Sola (1,2), M Gonzalez-Gross (1,3), V Lemmen (1,3), D Janke (3), MJ Castillo (1), K Pietrzik (3).



(1) Dpt. Physiology, School of Medicine, University of Granada, Spain. (2) Haematology Service, Clinical University Hospital, Granada, Spain. (3) Dpt. Pathophysiology of Human Nutrition, Institute of Nutrition, University of Bonn, Germany.

mggross@canal21.com

BACKGROUND

Megaloblastic anaemia is a classical manifestation of vitamin B₁₂ deficiency. Nevertheless, other markers might be more sensitive and/or specific. In this setting the use of functional markers for vitamin B₁₂ deficiency like Holo-transcobalamin (Holo-TC), and methylmalonic acid (MMA) can be more adequate than serum B₁₂, as has been published in several studies in the literature. B₁₂ deficiency especially affects the elderly and has been related to chronic degenerative diseases like coronary heart disease, cognitive impairment and dementia. Data about the real vitamin B₁₂ status of the Spanish elderly population are scarce. Early diagnosis of vitamin B₁₂ deficiency is essential, because despite of these sub clinical manifestations, neuropathy can be irreversible.

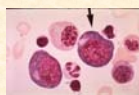


Figure 1. Megaloblastic anemia

OBJECTIVE

The aim of the study was to assess the pattern of morphological and biochemical markers of vitamin B₁₂ deficiency in order to find early and reliable indicators of vitamin B₁₂ deficiency in a group considered at risk, that is institutionalized elderly.

MATERIAL AND METHODS

This study is part of a larger cross-sectional study that aims to establish the vitamin B status of Spanish elderly, specifically B₆, B₁₂ and folate and to facilitate early diagnosis of vitamin deficiency. It has been supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria of the Spanish Ministry of Health. One-hundred and nineteen elderly aged 60 – 90 years, living in the Elderly's Home "La Milagrosa", in Armilla (Granada), Spain, were recruited for the study. After presentation of the study protocol, written informed consent was obtained from interested subjects. All residents took part in the study, the data shown are for 66% of all elderly living at the Residence. The study was approved by the Human Research Review Committee of the Universidad of Granada, School of Medicine. The study has been performed following the ethic norms of the Declaration of Helsinki 1996 (revision of Edinburgh 2000), Convention of Oviedo, the Good Clinical Practice of the CEE (document 111/3976/88 July 1990) and the Spanish legislation about clinical research in humans (Real Decreto 561/1993 sobre ensayos clínicos). After an overnight fast, blood samples were drawn between 8:00 and 10:00 h in the morning via venipuncture of the antecubital vein. Blood was distributed as follows: 4 ml in a vacutainer with EDTA for hematology, hypersegmentation of Polymorph Nuclear Neutrophils (PNN), and red blood cell (RBC) folate (Abbott, IMX). Eight ml in a vacutainer with gel and centrifuged within one hour. Serum was collected in 2 eppendorf's and immediately analyzed for serum B₁₂, folate, total homocysteine (tHcy) (IMX, Abbott) and Holo-transcobalamin (Holo-TC) (RIA, Axis-Shield). Methylmalonic acid (MMA) was sent to the laboratory at the University of Bonn always frozen by specialised Courier and analysed by GC-MS.

REFERENCES

- Herzlich B, Herbert V. Depletion of serum holotranscobalamin II. An early sign of negative vitamin B12 balance. Lab Invest 1988;58:332-337.
 - Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, et al. Diagnosis of cobalamin deficiency. II: relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. Am J Hematol 1990;34:99-107.
 - Nexo E, Christensen AL, Hvas AM, Petersen TE, Fedosov SN. Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. Clin Chem 2002;48:561-562.
 - Wickramasinghe SN, Fida S. Correlations between holo-transcobalamin II, holo-haptocorrin, and total B12 in serum samples from healthy subjects and patients. J Clin Pathol 1993;46:537-539.
- * Project granted by the Spanish Ministry of Health (FIS P021830) and Axis-Shield (Oslo, Norway). Reagents for HoloTC assay were kindly provided by Axis. Acknowledgements: Participants in this research work are Dr F. Morales and Dr G. Oriuela, physicians in charge of the patients under study at the Residencia de Ancianos La Milagrosa, Armilla, Granada. The skillful technical assistance of Ms R. Arcas is gratefully acknowledged.

RESULTS

Megaloblastic anaemia was observed in 3%, macrocytosis in 5% of the subjects, hypersegmentation was present in 11.0%. Hypersegmentation was related to isolated serum B12 deficiency in 4 cases, isolated folate deficiency in 10% and combined vitamin deficiency in 3 cases. There was a significant positive correlation between Holo-TC and serum B12 ($r=0.822$; $p<0.01$), serum folate ($r=0.268$; $p<0.05$), RBC folate ($r=0.292$; $p<0.05$) and a significant inverse correlation between Holo-TC and AMM ($r=-0.531$; $p<0.01$) and HPNN ($r=-0.352$; $p<0.01$). No single case of hypersegmentation was observed without the coexistence of either abnormal B12 respectively Holo-TC or folate values.

Table 1. Vitamin status in institutionalized elderly

Parameter	Value (SD)	% above
Serum B12 (pg/ml)	422(139.8)	10.2
Holo-TC (pmol/L)	72(12.9)	10.48
MMA (nmol/L)	121(21.98)	11.1
RBC folate (ng/ml)	171(13.8)	11.48
Serum folate (ng/ml)	12(13.8)	12.48
tHcy (ng/ml)	14(12.9)	11.1
HPNN (%)	11.0	11.0

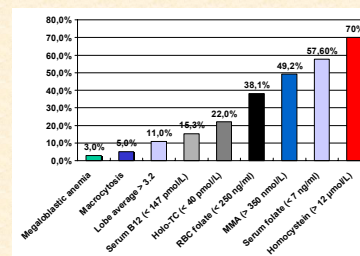


Figure 2. Prevalence of vitamin B12-deficiency in institutionalized elderly measured by different parameters

CONCLUSIONS

Abnormalities in serum levels of B₁₂, folate and/or Holo-TC precede the haematological signs (lobularity, macrocytosis or megaloblastic anaemia) at least in institutionalized elderly subjects. Functional markers like Holo-TC and MMA might be more efficient in the detection of early vitamin B₁₂ deficiency compared to serum B₁₂ analysis. B vitamin (folate and B₁₂) deficiency is prevalent in Spanish elderly. Serum cobalamin as a classical marker for vitamin B₁₂ deficiency may lead to underestimation of the problem. Discrepancies between the different markers indicate the need for further investigation.

MARCADORES BIOQUÍMICOS Y MORFOLÓGICOS DE LA DEFICIENCIA DE VITAMINA B₁₂



¿Existe la detección precoz de una deficiencia funcional de B₁₂?



R. Sola (1,2), M González-Gross (2,3), V Lemmen (2,3), D Janke (3), MJ Castillo (3), K Pietrzik (3).

(1) Servicio de Hematología. Hospital Clínico Universitario San Cecilio, Granada, España.

(2) Dpto. Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España.

(3) Dpto. Fisiopatología de la Nutrición Humana. Instituto de Nutrición, Universidad de Bonn. Alemania.

mggross@canal21.com

FUNDAMENTOS

La anemia megaloblástica es una manifestación clásica de la deficiencia de vitamina B₁₂. Sin embargo, puede haber otros marcadores más sensibles y/o específicos para la detección de esta deficiencia en estadios tempranos. La holo-transcobalamin (holo-TC), la forma funcional de la vitamina B₁₂ puede ser uno de esos marcadores.

OBJETIVO

Evaluar el patrón de los marcadores morfológicos y bioquímicos de la deficiencia de vitamina B₁₂ con el fin de encontrar uno o varios indicadores precoces de dicha deficiencia.

MÉTODOS

En 170 ancianos institucionalizados de ambos sexos con edades comprendidas entre los 60 y 95 años se determinaron los siguientes parámetros: cobalamina sérica (Abbott IMX), holo-TC (Axis-Shield), ácido metilmalónico (MMA, GC-MS), folato sérico, folato eritrocitario, homocisteína total (tHcy) (Abbott, IMX), e hipersegmentación neutrófila.

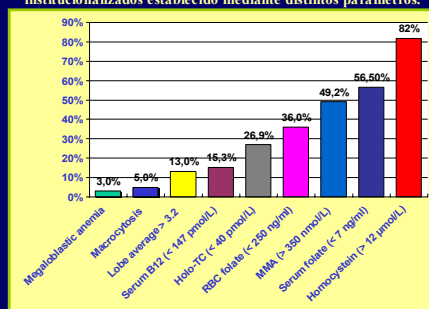
Tabla 1. Estado vitamínico y parámetros relacionados en ancianos institucionalizados

Parámetro	Media +/-DS	Mediana
B12 sérico (pg/ml)	415,09±31,42	348
holo-TC (pmol/L)	80,18±88,78	57,13
MMA (nmol/L)	603,21±1306,14	312
tHcy (µmol/L)	17,16±9,20	15,07
folato sérico (ng/ml)	7,16±3,6	6,35
folato eritrocitario (ng/ml)	358,01±199,13	299
creatinina (mg/dl)	1,1±0,38	1,02

RESULTADOS

Según los parámetros analizados, la prevalencia de la deficiencia sub-clínica de vitaminas fue la siguiente: 56,5% folato sérico (< 7 ng/ml), 36% folato eritrocitario (< 250 ng/ml). La prevalencia de deficiencia de vitamina B₁₂ fue del 26,9% según la determinación de holo-TC (< 40 pmol/L), mientras que únicamente fue del 13,75% según los valores séricos de B₁₂ (< 179 pg/ml). Valores elevados de MMA (> 350 nmol/L) se observaron en el 49,2% de los casos, valores elevados de tHcy en el 81,8%. Hipersegmentación neutrófila se apreció en el 13% de los casos.

Figura 1. La prevalencia de la deficiencia de B₁₂ en ancianos institucionalizados establecido mediante distintos parámetros.



CONCLUSIONES

Las anomalías en los niveles séricos de B₁₂, folato y/o holo-TC preceden a los signos hematológicos (lobularidad aumentada), al menos en ancianos institucionalizados. La holo-TC puede representar un parámetro más eficiente de detección precoz de la deficiencia de vitamina B₁₂ comparado con el análisis sérico de la vitamina B₁₂, aunque dada la escasez de datos en la bibliografía se debe profundizar en este aspecto.

BIBLIOGRAFÍA

Herzlich B, Herbert V. Depletion of serum holotranscobalamin II. An early sign of negative vitamin B12 balance. Lab Invest 1988;58:332-337.

Lindbaum J, Savage DG, Stabler SP, et al. Diagnosis of cobalamin deficiency. II: relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. Am J Hematol 1990;34:99-107.

Nexo E, Christensen AL, Hvas AM, Petersen TE, Fedosov SN. Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. Clin Chem 2002;48:561-562.

Wickramasinghe SN, Fida S. Correlations between holo-transcobalamin II, holo-haptocorrin, and total B12 in serum samples from healthy subjects and patients. J Clin Pathol 1993;46:537-539.

*Proyecto financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS P1021830). Los reactivos para la determinación de la holo TC II fueron suministrados por Axis-Shield (Oslo, Norway). Agradecimientos a Dr. F. Morales, Dr. G Orihuela, Dr. R. Arcas y Dr. P. Carazo por su colaboración en este estudio.

Folate deficiency is the strongest determinant of the frequency and severity of hyperhomocysteinemia in a group of institutionalized Spanish elderly people.



V Lemmen^{1,2}, M González-Gross^{1,2}, R Sola^{1,3}, D Janke², F Morales¹, K Pietrzik²

¹Dpt. Physiology, School of Medicine, University of Granada, Spain.

²Dpt. Pathophysiology of Human Nutrition, Institute of Nutritional Science, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn, Germany.

³Haematology Service, Clinical University Hospital San Cecilio, Granada, Spain.



Background

Hyperhomocysteinemia is associated with chronic diseases such as cerebrovascular and coronary artery disease. B-vitamin deficiency seems to be the main cause for high homocysteine levels. The coexistence of folate and B₁₂ deficiency might be responsible for the severity and prevalence of hyperhomocysteinemia in the elderly, but reliable data on the occurrence of folate and vitamin B₁₂ deficiency in the elderly are scarce.

Objective

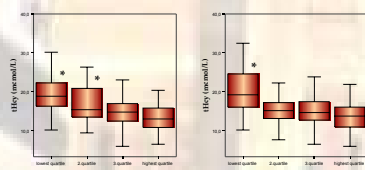
The objective of this study was to investigate the contribution of combined folate and B₁₂-deficiency to hyperhomocysteinemia in the elderly.

Material and Methods

One-hundred and seventy elderly of both gender and a mean age of 78.1 ± 8.6 years, living in the Elderly Home "La Milagrosa" in Armilla, Granada (Spain), were screened for serum folate, red blood cell (RBC) folate, serum cobalamin (Abbott, IMx), holotranscobalamin II (holo-TC II) (HoloTC RIA, Axis-Shield), and total Homocysteine (tHcy) (Abbott, IMx).

Results

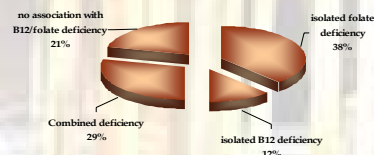
Mean homocysteine concentrations in quartiles of serum and RBC folate



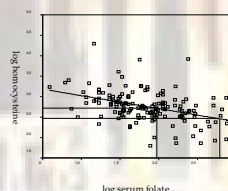
* significantly different ($P < 0.05$) to the mean of the highest quartile (one-way ANOVA with post-hoc Scheffé test).

The prevalence of folate deficiency was 51 %. Forty-seven percent had low serum folate (< 6 ng/ml) and 35 % had low RBC folate (< 250 ng/ml). The prevalence of vitamin B₁₂ deficiency was 30 %. Sixteen percent had low serum B₁₂ (< 200 pg/ml) levels and 27 % had low holo-TC II (< 40 pmol/L). More than half of our study population (51 %) presented high tHcy levels ($\geq 15 \mu\text{mol/L}$). In a multiple linear regression analysis log serum folate was the most powerful independent predictor of log total homocysteine, followed by log holo-TC II. Mean homocysteine levels were significantly higher in the highest two quartiles of serum folate compared to the lowest.

Determinants of high homocysteine levels



Relation between log serum total homocysteine and log serum folate



Regression line: $y = 3.34 - 0.32x$.
S curve fit ($r = 0.41$, $P < 0.001$).
The horizontal line shows the cut-off of tHcy = 15 $\mu\text{mol/L}$ which cuts the regression line at log serum folate = 2.67 (= 14.5 ng/mL).
The second horizontal line shows the cut-off of tHcy = 12 $\mu\text{mol/L}$ which cuts the regression line at log serum folate = 1.97 (= 7.2 ng/mL).

Conclusion

There is a very high prevalence of B-Vitamin deficiency in Spanish institutionalized elderly. Our data confirm an important role for blood levels of B-Vitamins in homocysteine metabolism. We found folate deficiency to be the strongest determinant of high homocysteine levels. However, isolated B₁₂ deficiency or combined B₁₂ and folate deficiency aggravate the frequency and severity of hyperhomocysteinemia. Twenty-one percent were neither correlated to vitamin B₁₂ nor to folate deficiency, which may be due to vitamin B₂ or B₆ deficiencies that have not been determined in our study. This will be part of further research.

References

- [1] C.J. Boushey, S.A.A. Beresford, G.S. Omenn and A.G. Motulsky (1995) A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Journal of the American Medical Association, 274, 1049-1057.
- [2] I.M. Graham, L.E. Daly, H.M. Refsum et al. (1997) Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project. Journal of the American Medical Association, 277, 1775-1781.
- [3] J. Selhub, P. Jacques, P.W.F. Wilson, D. Rush and I.H. Rosenberg (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. Journal of the American Medical Association, 270, 2693-2698.

The project has been granted by the Spanish Ministry of Health (FIS PI021830). Prof. Manuel J. Castillo is the project leader. Axis-Shield (Oslo, Norway) has kindly provided the holo-TC RIA reagent kit. We want to thank Mr. G Orihuela, Mrs. R Arcas and Mrs. P Carazo for their collaboration in this study.

Vitamin B₁₂-Mangel Prävalenz bei institutionalisierten spanischen Senioren

V. Lemmen (1), M. González-Gross (1), R. Sola (2), D. Janke (1), G. Orihuela (3), K. Pietrzik (1)

(1) Institut für Ernährungswissenschaft, Abteilung Pathophysiologie der Ernährung, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn



(2) Facultad de Medicina, Dpt. de Fisiología, Universidad de Granada (Spanien)
 (3) Residencia de Ancianos "La Milagrosa" Armilla (Granada, Spanien)



Problemstellung

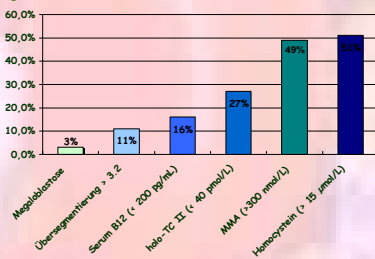
Die Gefahr einen Vitamin B₁₂-Mangel zu entwickeln ist aufgrund häufiger Gastritiden speziell bei älteren Menschen erhöht. Eine biochemische Früherkennung ist aufgrund mangelnder Methodik bis heute routinemäßig nicht möglich. Die Messung des Serumcobalamins (SCbl) führt häufig zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen, weshalb seit einigen Jahren neben der Methylmalonsäure (MMA)-Messung die Erfassung des funktionellen Vitamin B₁₂-Anteils in Form von Holotranscobalamin II (Holo-TC) in Forschungseinrichtungen eingesetzt wird. Die Studie verfolgt das Ziel, verschiedene morphologische und biochemische Parameter der B₁₂-Versorgungssituation vergleichend zu betrachten.

Methoden

Blutproben von 170 institutionalisierten spanischen Senioren (mittleres Alter 78.1 Jahre) wurden auf SCbl (Abbott, IMx), Holo-TC (HoloTC-RIA, Axis-Shield), MMA (GC-MS), Gesamtserumhomocystein (tHcy), Erythrozytenfolat und Serumfolat (Abbott, IMx) analysiert.

Ergebnisse

Prävalenz von Vitamin B₁₂-Mangel in dieser Studienpopulation gemessen anhand von verschiedenen Parametern



Die Multiple lineare Regressionsanalyse zeigt, welcher Anteil der Variation des Serum-Homocysteins (tHcy) durch die verschiedenen Vitaminkonzentrationen erklärt werden kann¹

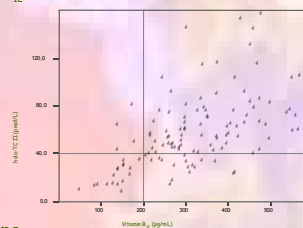
	R	R ²	P
		%	
Log serum folate	0.41	17	< 0.001
Log holo-TC II	0.53	28	< 0.001

¹ R, multipler Korrelationskoeffizient, nach schrittweiser Regressionsanalyse
 R², Prozent der Variation des tHcy, dass durch die biochemischen Parameter erklärt werden kann

Die Prävalenz einer Megaloblastose lag lediglich bei 3%, die Übersegmentierung der neutrophilen Granulozyten bei 11%. Biochemisch zeigten 16 % niedrige SCbl-Spiegel (< 200 pg/ml), während bei 27 % erniedrigte Holo-TC Werte (< 40 pmol/L) gemessen wurden. Das Serumfolat war niedrig (< 6 ng/ml) bei 47 % und das Erythrozytenfolat (< 250 ng/ml) bei 35 %. Die Korrelation zwischen SCbl und Holo-TC war hoch (r = 0,77, p < 0,001).

Eine multiple lineare Regressionsanalyse zeigte, dass die erhöhten tHcy-Werte (51% > 15 µmol/L) in den überwiegenden Fällen durch Folat- oder B₁₂-Mangel erklärt werden können.

Streudiagramm der einzelnen Individuen anhand der Vitamin B₁₂ und Holo-TC Konzentrationen



Schlussfolgerung

Die Daten bestätigen eine höhere Sensitivität des Holo-TC gegenüber SCbl. Da die hohen Hcy-Werte jedoch hauptsächlich durch die niedrigen Folatspiegel zu erklären sind, scheint es nicht sinnvoll Hcy als Parameter für den B₁₂-Mangel heranzuziehen. Die hohe Prävalenz eines B₁₂- Mangels bei spanischen institutionalisierten Senioren erfordert eine intensivere Erforschung dieses Problems auch in anderen Ländern.

Literatur

- [1] C.J. Boushey, S.A.A. Beresford, G.S. Omenn and A.G. Motulsky (1995) A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Journal of the American Medical Association, 274, 1049-1057.
- [2] I.M. Graham, L.E. Daly, H.M. Refsum et al. (1997) Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project. Journal of the American Medical Association, 277, 1775-1781.
- [3] J. Selhub, P. Jacques, P.W.F. Wilson, D. Rush and I.H. Rosenberg (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. Journal of the American Medical Association, 270, 2693-2698.

*Mit finanzieller Unterstützung des Spanischen Gesundheitsministeriums (FIS PI021830). Prof. Manuel J. Castillo ist Projektleiter. Axis-Shield (Oslo, Norway) hat die holo-TC RIA Reagenzienkits zur Verfügung gestellt. Dr. F. Morales, Frau R. Arcas und Frau P. Carazo danken wir für ihre Hilfe.

Validity of serum cobalamin, holotranscobalamin or methyl malonic acid for determination of vitamin B₁₂ status



V Lemmen^{1,2}, M Gonzalez-Gross^{1,2}, R Sola^{1,3}, D Janke², S Seher^{1,2}, MJ Castillo¹, K Pietrzik²

¹Dpt. Physiology, School of Medicine, University of Granada, Spain.

² Dpt. Pathophysiology of Human Nutrition, Institute of Nutritional Science, University of Bonn, Germany.

³ Haematology Service, Clinical University Hospital San Cecilio, Granada, Spain.

Aims The elderly population is particularly at risk for developing vitamin B₁₂-deficiency. Inadequate diets, diseases like atrophic gastritis or intestinal malabsorption are the main reasons for vitamin B₁₂-deficiency in this age group. Sensitive methods for early detection of vitamin B₁₂-deficiency are not common in the routine laboratory. Normal serum cobalamin (SCbl) does not necessarily reflect a normal B₁₂ status. Therefore, besides determining methyl malonic acid (MMA), holotranscobalamin (Holo-TC), the fraction of functional vitamin B₁₂, has been proposed as a more sensitive B₁₂ status indicator. The objective of this study is to establish B₁₂ status by different methods and to compare their validity.

Methods One-hundred and eighty elderly of both gender and a mean age of 78.1 ± 8.6 years, living in the Elderly Home "La Milagrosa" in Armilla, Granada (Spain). After an overnight fast, blood samples were drawn between 8:00 and 10:00 h in the morning without stasis via venipuncture of the antecubital vein. Blood was screened for SCbl (Abbott, IMx), Holo-TC (HoloTC-RIA, Axis-Shield), total homocysteine (tHcy), red blood cell (RBC) folate and serum folate (Abbott, IMx). Methylmalonic acid (MMA, GC-MS) was analysed for only half of our study population (n= 90). Serum for this analysis was sent to the laboratory at the University of Bonn always frozen by specialised Courier and analysed by HPLC.

Figure 1 Prevalence of vitamin B₁₂-deficiency in institutionalized elderly measured by different parameters

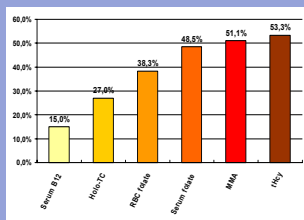


Figure 2 Distribution of individuals according to their Vitamin B₁₂ and HoloTC concentrations

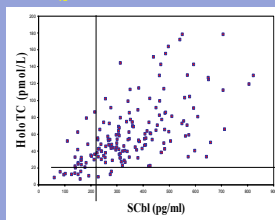


Figure 3 Distribution of individuals in different categories defined by HoloTC, SCbl and MMA concentrations (n=90)

HoloTC	>37 pmol/L	SCbl > 200 pg/ml	MMA < 300 nmol/L	25
	>37 pmol/L	SCbl < 200 pg/ml	MMA < 300 nmol/L	41
HoloTC	<37 pmol/L	SCbl > 200 pg/ml	MMA < 300 nmol/L	0
	<37 pmol/L	SCbl < 200 pg/ml	MMA < 300 nmol/L	2
HoloTC	>37 pmol/L	SCbl > 200 pg/ml	MMA ≥ 300 nmol/L	7
	>37 pmol/L	SCbl < 200 pg/ml	MMA ≥ 300 nmol/L	4
HoloTC	<37 pmol/L	SCbl > 200 pg/ml	MMA ≥ 300 nmol/L	11
	<37 pmol/L	SCbl < 200 pg/ml	MMA ≥ 300 nmol/L	0

Results Twenty-seven subjects presented SCbl values lower than 200 pg/ml (15.0 %). Forty-nine showed Holo-TC values lower than 37 pmol/L (27.2 %) and 46 of 90 had MMA values over 300 nmol/L (51.1 %). Of those subjects with low SCbl 22 (81.5 %) also showed low Holo-TC. Thirteen subjects of this group had MMA determined and this was abnormal in all cases. In the Holo-TC normal group the SCbl results agreed in 96 %, whereas only 44.9 % in the low Holo-TC group presented low SCbl. MMA values showed no clear pattern. If MMA was used to screen for B₁₂ status in this elderly group then just over 50% of them would be identified as deficient. This is likely less than double the number that are deficient based on Holo-TC. Using only SCbl to assess B₁₂ status would reveal only half those identified based on Holo-TC. Total homocysteine was higher than 15µmol/L (53.3 %) in more than fifty percent (96 out of 180) of our study population.

Conclusion These results support the complexity of determining B₁₂ status. The discrepancy of data showed that HoloTC had a higher sensitivity for detection of B₁₂ compared to SCbl. It has been proposed in the past that MMA could be an earlier marker of functional deficiency and that this explains the differences between MMA and SCbl. If we consider that Holo-TC is an early marker of B₁₂ deficiency this explanation does not hold. Our data suggest that there is a high incidence of abnormal MMA not explained by B₁₂ status. Total hcy was not looked at because of the complication of folate status. Further investigation, especially a longitudinal study aimed at addressing this question, would be of interest.

References: 1) Herzlich B, Herbert V. Depletion of serum holotranscobalamin II. An early sign of negative vitamin B₁₂ balance. Lab Investig 1988;58:332-337. 2) Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, et al. Diagnosis of cobalamin deficiency. II: relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. Am J Hematol 1990;34:99-107. 3) Nexø E, Christensen AL, Hvas AM, Petersen TE, Fedosov SN. Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B₁₂ deficiency. Clin Chem 2002;48:561-562. 4) Wickramasinghe SN, Fida S. Correlations between holo-transcobalamin II, holo-haptocorrin, and total B₁₂ in serum samples from healthy subjects and patients. J Clin Pathol 1993;46:537-539.

The project has been granted by the Spanish Ministry of Health (FIS PI021830). Axis-Shield (Oslo, Norway) has kindly provided the holo-TC RIA reagent kit. We want to thank Mr. G Oriuela, Mr. F Morales, Mrs. R Arcas and Mrs. P Carazo for their collaboration in this study.
Contact e-mail: marcela.gonzalez-gross@uni-bonn.de

INFLUENCIA DE LAS VITAMINAS DEL GRUPO B SOBRE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA EN ANCIANOS INSTITUCIONALIZADOS

Sola R(1,2) González-Gross M(2,3), Seher S(2,3), Lemmen V(2,3), Pietrzik K(3), Castillo MJ(2).



(1) Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario San Cecilio, Granada, España.

(2) Dpto. Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España.

(3) Dpto. Fisiopatología de la Nutrición Humana, Instituto de Nutrición, Universidad de Bonn, Alemania. marcela.gonzalez-gross@uni-bonn.de

INTRODUCCIÓN

La hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular y manifestación del estado deficitario de vitaminas del grupo B, folato, vitaminas B6 y B12. Todas ellas intervienen en el ciclo de la Metionina aunque no influyen en la hiperhomocisteinemia con igual intensidad.

OBJETIVOS

El objetivo es investigar la contribución de los déficits de vitaminas del grupo B, folato, B6 y B12 a la hiperhomocisteinemia en ancianos institucionalizados.

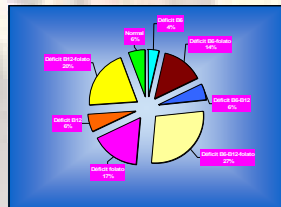
MATERIAL Y METODOS

Se estudian 218 ancianos, 82 hombres y 136 mujeres con edad entre 60-105 años. Tras ayuno de doce horas y por punción de la vena cubital, se extrae la sangre en 1 tubo con EDTA para hematimetría completa (ADVIA-120 BAYER), estudio de hipersegmentación neutrófila y folato intraeritrocitario (IMX Abbott). Ocho cc en tubos con gel para la obtención de suero que se depositan en baño de hielo y se centrifugan antes de 1 hora para determinación de bioquímica completa (Hitachi-911 ROCHE) B12 sérica, folato, homocisteína total (tHcy) (IMX, Abbott) Holotranscobalamina (Holo-TC) (RIA, Axis-Shield) y AMM (GC-). 4 cc de sangre total heparinizada para determinación de vitamina B6. Las muestras que no se procesaron antes de 1 hora, se congelaron a -80°C.

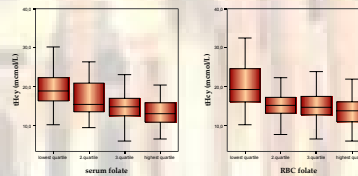
RESULTADOS

Se diagnostican 176 ancianos con tHcy ≥ 12 $\mu\text{mol/L}$. 106 (43.11%) con el folato sérico ≤ 6 ng/ml (tHcy X 21.54) y con folato intraeritrocitario ≤ 175 ng/ml 13 (7.33 %), de estos 16 tienen ambos bajos. lo que representa 119 ancianos deficientes que representan un 54.84 % de prevalencia de déficit de folato. 38 sujetos (7.33%) tienen una B12 sérica ≤ 200 , 52 ancianos (23.85%) Holo-TC ≤ 45 y 29 el AMM ≥ 300 , lo que representa una prevalencia para el déficit de vitamina B12 de 119 ancianos que representan el 54.84 %. Déficit mixto B12-folato, 76 ancianos que representan el 34.86%. En un análisis de regresión lineal múltiple el log del folato sérico ($r = -0.536$) es el más fuerte factor predictor independiente de hiperhomocisteinemia (log tHcy), seguido de log folato intraeritrocitario ($r = -0.342$), Log AMM ($r = 0.342$), log Holo-TC ($r = -0.200$), log B6 ($r = -0.109$) y por último log B12 ($r = -0.095$).

Prevalencia general de déficit de vitaminas del grupo B



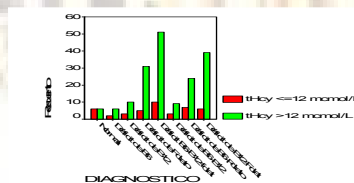
Mean homocysteine concentrations in quartiles of serum and RBC folate



* significantly different ($P < 0.05$) to the mean of the highest quartile (one-way ANOVA with post-hoc Scheffé test).

Diagnóstico del déficit en función de los niveles de homocisteína

DIAG	R_tHcy		Total
	≤ 12	> 12	
Normal	6	6	12
Déficit de B6	2	6	8
Déficit de B12	3	10	13
Déficit de Folato	5	31	36
Déficit B6-B12-folato	10	51	61
Déficit de B6-B12	3	9	12
Déficit de B6-Folato	7	24	31
déficit de B12-Folato	6	39	45
Total	42	176	218



Conclusion

Existe una elevada prevalencia de deficiencia de vitaminas del grupo B en el grupo de población estudiada. La deficiencia combinada de B6, B12 y folato es la más frecuente, seguida de la aislada de folato. Nuestros datos confirman la influencia de los niveles de vitaminas del grupo B, en especial folato, sobre los de homocisteína, aunque la hiperhomocisteinemia no se puede emplear como único criterio diagnóstico para detectar el déficit subclínico de vitaminas en ancianos, en especial para detectar el déficit de B12.

Bibliografía

- Herzlich B, Herbert V. Depletion of serum holotranscobalamin II. An early sign of negative vitamin B12 balance. Lab Invest 1988;58:332-337.
 Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, et al. Diagnosis of cobalamin deficiency. II: relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. Am J Hematol 1990;34:99-107.
 Nexø E, Christensen AL, Hvas AM, Petersen TE, Fedosov SN. Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. Clin Chem 2002;48:561-562.
 Selhub P, Jacques P.W.F, Wilson D, Rush and L.H. Rosenberg (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. Journal of the American Medical Association, 270, 2693-2698.

Proyecto financiado por el Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (FIS PI021830). Axis-Shield (Oslo, Norway) facilitó los kits para la determinación de holo-TC RIA. Nuestro agradecimiento a R Arcas, P Carazo y R.Pérez por su colaboración en este estudio.

Diagnostic scheme for the early diagnosis of vitamin B₁₂ deficiency in elderly people.



Sola R^{1,2} González-Gross M^{2,3,4}, Barrios L⁵, Janke D⁴, Pietrzik K⁴, Castillo MJ²

¹Grupo EFFECTS 262. Dpt. Physiology, School of Medicine, University of Granada, Spain.

²Haematology Service, Clinical University Hospital San Cecilio, Granada, Spain.

³Facultad de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte. Universidad Politécnica de Madrid. Spain.

⁴Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften. Pathophysiologie. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität. Bonn. Germany.

⁵Centro Técnico de Informática. CSIC. Spain.



Background

The elderly population is particularly at risk for developing vitamin B₁₂-deficiency. Inadequate diets, diseases like gastritis or intestinal malabsorption are the main reasons for vitamin B₁₂-deficiency in this age group. Sensitive methods for early detection of vitamin B₁₂-deficiency are not common in the routine laboratory. Normal serum cobalamin (SCbl) does not necessarily reflect a normal B₁₂ status. The determination of methyl malonic acid (MMA) is very expensive and not routinely possible. Holotranscobalamin II (Holo-TC II), the fraction of functional vitamin B₁₂, has been proposed as a more sensitive B₁₂ status indicator.

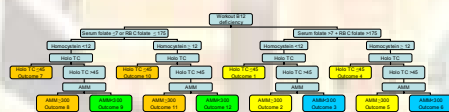
Objective

The aim of the present study is to establish a diagnostic scheme (DiagS) taking into account both clinical and economical criteria.

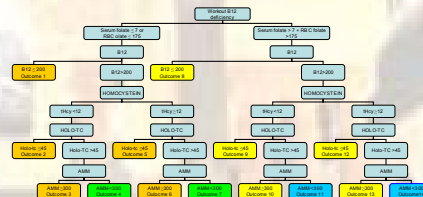
Material and Methods

Two-hundred and eighteen elderly of both sexes, aged 60-105, living in an Elderly Home in Granada (Spain), were screened for SCbl (Abbott, IMx), (Holo-TC II) (HoloTC RIA, Axis-Shield, MMA (MS-GC), serum folate, red blood cell (RBC) folate, and tHcy (Abbott, IMx), which were the variables chosen based on clinical criteria.

Results



Diagnostic scheme 1. Start with serum cobalamin and include 14 possible outcomes for diagnosing B₁₂ deficiency. Yellow squares express pure B₁₂ deficiency; orange squares express combined B₁₂/folate deficiency; green square express pure folate deficiency; dark blue squares express normal subjects.



Diagnostic scheme 2. started with Holo-TC II and included 12 possible outcomes for diagnosing B₁₂ deficiency. Yellow squares express pure B₁₂ deficiency; orange squares express combined B₁₂/folate deficiency; green square express pure folate deficiency; dark blue squares express normal subjects.

Diagnostic scheme 1 identified 8.7% pure B₁₂ deficiency, 50.9% combined B₁₂/folate deficiency, 31.2% pure folate deficiency and 6.0% as being normal.

Diagnostic scheme 2 identified 9.6% pure B₁₂ deficiency, 67.0 % combined B₁₂/folate deficiency, 14.7% pure folate deficiency and 5.0% as being normal.

Conclusion

The proposed diagnostic scheme which eliminates SCbl and starts the screening with Holo-TC II seems to be more precise in detecting functional vitamin B₁₂ deficiency and the combined folate/B₁₂ deficiency in institutionalized elderly. The reason for the different number in each of the deficiency groups in both DiagS has to be analysed more in depth.

References

- [1] C.J. Boushey, S.A.A. Beresford, G.S. Omenn and A.G. Motulsky (1995) A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Journal of the American Medical Association, 274, 1049-1057.
- [2] I.M. Graham, L.E. Daly, H.M. Refsum et al. (1997) Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project. Journal of the American Medical Association, 277, 1775-1781.
- [3] J. Selhub, P. Jacques, P.W.F. Wilson, D. Rush and I.H. Rosenberg (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. Journal of the American Medical Association, 270, 2693-2698.

The project has been granted by the Spanish Ministry of Health (FIS PI021830). Prof. Manuel J. Castillo is the project leader. Axis-Shield (Oslo, Norway) has kindly provided the holo-TC RIA reagent kit. We want to thank Mr. G Orihuela, Mrs. R Arcas and Mrs. P Carazo for their collaboration in this study.

Hyperhomocysteinemia as diagnostic criterion for vitamin B deficiency in institutionalized elderly

Sola R^{1,2} González-Gross M^{2,3,4}, Barrios L⁵, Janke D⁴, Pietrzik K⁴, Castillo MJ²



¹Grupo EFFECTS 262. Dpt. Physiology, School of Medicine, University of Granada, Spain.

²Haematology Service, Clinical University Hospital San Cecilio, Granada, Spain.

³Facultad de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte. Universidad Politécnica de Madrid, Spain.

⁴Institut für Ernährungs-und Lebensmittelwissenschaften. Pathophysiologie. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität. Bonn. Germany.

⁵Centro Técnico de Informática. CSIC. Spain.



Background

Hyperhomocysteinemia is an accepted risk factor for cardiovascular disease, and possibly also for cognitive impairment and dementia. It has also been proposed as a marker of the status of the B vitamins which are implicated in the metabolic circle.

Objective

To know the prevalence of high homocysteine (tHcy) levels and the influence that B vitamins have on them.

Material and Methods

Two-hundred and eighteen elderly of both sexes, aged 60-105, living in an Elderly Home in Granada (Spain), were screened for serum folate, red blood cell (RBC) folate, serum cobalamin (Abbott, IMx), holotranscobalamin II (holo-TC II) (HoloTC RIA, Axis-Shield), Methylmalonic Acid (AMM) (MS-GC), total pyridoxine (B6)(HPLC) and tHcy (Abbott, IMx).

Results

		SEX		Total
		Male	Female	
B12 <=200	Recuento	16	22	38
	% de sexo	19.5%	16.2%	17.4%
>200	Recuento	66	114	180
	% de sexo	80.5%	83.8%	82.6%
Total	Recuento	82	136	218
	% de sexo	100.0%	100.0%	100.0%

Table 1. Contingency table of B12 by sex.

		SEX		Total
		Male	Female	
Homocisteina <13	Recuento	17	36	53
	% de sexo	25.8%	31.6%	29.4%
≥13	Recuento	49	78	127
	% de sexo	74.2%	68.4%	70.6%
Total	Recuento	66	114	180
	% de sexo	100.0%	100.0%	100.0%

Table 2. Contingency table of homocysteine by sex.

		Holo-TC		Total
		<=45	>45	
Homocisteina <13	Recuento	14	37	51
	% de sexo	27.5%	72.5%	100.0%
≥13	Recuento	38	87	125
	% de sexo	30.4%	69.6%	100.0%
Total	Recuento	52	124	176
	% de sexo	29.5%	70.5%	100.0%

Table 3. Contingency table of homocysteine Holo-TC.

		AMM		Total
		<300	≥300	
Holo-TC <=45	Recuento	8	5	13
	% de R_HOLOTC	61.5%	38.5%	100.0%
>45	Recuento	22	7	29
	% de R_HOLOTC	75.9%	24.1%	100.0%
Total	Recuento	30	12	42
	% de R_HOLOTC	71.4%	28.6%	100.0%

Table 4. Contingency table of HOLO-TC AMM B12 >200 and homocysteine <13

Conclusion

There is a high prevalence of vitamin B deficiency and hyperhomocysteinemia in the studied population. Our data confirm the influence of these vitamins, especially folate, on tHcy levels, but hyperhomocysteinemia can not be used as the only diagnostic criteria to detect subclinical vitamin deficiency in elderly people, especially to detect vitamin B12 and vitamin B6 deficiency.

References

- [1] C.J. Boushey, S.A.A. Beresford, G.S. Omenn and A.G. Motulsky (1995) A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Journal of the American Medical Association, 274, 1049-1057.
- [2] I.M. Graham, L.E. Daly, H.M. Refsum et al. (1997) Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project. Journal of the American Medical Association, 277, 1775-1781.
- [3] J. Selhub, P. Jacques, P.W.F. Wilson, D. Rush and I.H. Rosenberg (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. Journal of the American Medical Association, 270, 2693-2698.

The project has been granted by the Spanish Ministry of Health (FIS PI021830). Prof. Manuel J. Castillo is the project leader. Axis-Shield (Oslo, Norway) has kindly provided the holo-TC RIA reagent kit. We want to thank Mr. G Orihuela, Mrs. R Arcas and Mrs. P Carazo for their collaboration in this study.



ANEMIA PERNICIOSA FAMILIAR Y DEFICIT SELECTIVO DE IgA



R Sola (1,2), M Gonzalez-Gross (1,3), MJ Castillo (1), K Pietrzik (3).

(1) Dpt. Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. (2) Servicio de Hematología. Hospital Clínico Universitario de San Cecilio. Granada. (3) Dpt. Pathophysiology of Human Nutrition. Institute of Nutrition. University of Bonn. Germany.
mggross@canal21.com

Introducción:

Propia de la presenilidad y vejez, fue descrita por Addison en 1855. El estomago de estos enfermos, deja de segregar Factor Intrínseco. En la actualidad, se conoce el mecanismo inmunológico autoinmune responsable de las alteraciones gástricas y la malabsorción de vitamina B₁₂. Las células parietales del estomago, van desapareciendo progresivamente y se va configurando la gastritis atrófica.

Caso clínico:

Mujer de 43 años que acude a nuestra consulta procedente de su médico de cabecera para estudio de anemia no filiada. La paciente refería astenia y disnea al menor esfuerzo. En el Hemograma: leucocitos 3.900/mm³, Hb 7,2 g/dl, Hct^o 20,7%, VCM 118 fl. Plaquetas 144.000 mm³. la formula leucocitaria era normal con una morfología patológica que mostraba anisopoiquilocitosis acusada de predominio macrocítico, anisocromía y cuerpos de Howell-Jolly, así como los neutrófilos mostraban una acusada polisegmentación. Bioquímica hematológica: patrón ferrocinético normal, vitamina B₁₂ < 60 pg/ml, folato sérico e intraeritrocitario normales y homocisteína de 150 mcg/L. Bioquímica: LDH 1111 U/l, resto sin interés. Se le realizaron las siguientes pruebas complementarias: Punción de medula ósea, medula hiper celular compatible con anemia megaloblástica. ECO abdominal discreta esplenomegalia. La gastroscopia, compatible con gastritis atrófica. Proteinograma normal con una IgG < 6,1 mg/dl, IgG e IgM normales. Anticuerpos antinucleares (-), anti células parietales (+), anti factor intrínseco (+), antitiroglobulina, antiperoxidasa y antiendomisio negativos. Debido a la edad de la paciente hacemos estudio familiar (tabla inferior)

	Caso Clínico	Hermana	Hijo	Hija
Hb (gr/dl)	7.6	10.3	16.9	14.9
VCM (fl)	118	103	95.4	94.6
B12	< 60	100	227	229
Folatos	N	N	N	N
Homocisteína	150	48	29	8
Creatinina	N	N	N	N
IgA	< 6	108	116	190
Ac C. Parietales	+	+	□	□
Gastroscopia	+	+		
Inmunocomplejos	+			
ANA	□	□	□	+

Conclusiones.

Se diagnostican dos hermanas de anemia pernicioso, remitiendo los síntomas clínicos y datos analíticos tras tratamiento con cianocobalamina intramuscular. El propositus tenía asociado déficit selectivo y asintomático de IgA, que no se modificó con tratamiento el hijo varón mostraba hiperhomocisteinemia probablemente por déficit funcional de vitamina B12 y la hija ANA (+) de patrón moteado que está en evaluación.

Está demostrada la predisposición genética de esta enfermedad y su asociación a otras enfermedades autoinmunes, desarrollándose con más frecuencia en individuos con familiares afectados por la enfermedad. La asociación anemia pernicioso y déficit de IgA, no es infrecuente y cuando ocurre es necesario extremar los cuidados transfusionales, la posible presencia de anticuerpos anti IgA puede dar lugar a accidentes transfusionales graves e incluso muerte. Es recomendable el uso de hemáties lavados.

Bibliografía:

- 1.- Gueant JL, Candito M, Andres E, Van Obberghen E, Nicolas JP. Familial pernicious anaemia with hyperhomocisteinemia in recurrent early pregnancy loss. *Thromb Haemost.* 2004;92:1147-9.
- 2.- Heisel MA, Siegel SE, Falk RE, et al. Congenital pernicious anemia: report of seven patients, with studies of extended family. *J pediat.* 1984;105:564-8.
- 3.- Spector JL. Juvenile achlorhydric pernicious anemia with IgA Deficiency. A family study. *JAMA* 1974;228:334-6.

Einfluss von L-5-MTHF- und PGA-Supplementen auf Parameter des Vitamin B₁₂-Status von spanischen Heimbewohnern



Spinneker A¹, González-Gross M^{1,2,3}, Sola R³, Castillo MJ³, Pietrzik K¹

¹Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften - Humanernährung.
Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.

²Facultad de CC de la Actividad Física y del Deporte, Universidad Politécnica de Madrid. Spanien.

³Grupo Effects 262.Dpto. Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. Spanien.
a.spinneker@uni-bonn.de

Hintergrund

Folat- und Vitamin B₁₂-Unterversorgungszustände stellen aufgrund verschiedener Faktoren besonders bei Senioren ein häufiges Problem dar. Dieses äußert sich zunächst in einem Anstieg des Homocysteins (tHcy)-Spiegels und kann sich in einer megaloblastischen Anämie manifestieren. Da häufig nur eine Monotherapie mit Folsäure erfolgt, ist nicht auszuschließen, dass aufgrund der engen Verknüpfung zum Vitamin B₁₂-Stoffwechsel letzteres stärker verbraucht wird und sich der Vitamin B₁₂-Mangel zusätzlich verstärkt.

Ergebnisse

Sowohl die Gabe von L-5-MTHF als auch von PGA bewirkte eine hochsignifikante Verbesserung der tHcy- und Folatwerte bei den Heimbewohnern ($p \leq 0,001$). Das Serumfolat erhöhte sich über die Interventionsdauer um 849% auf 57,2 ng/mL und das Erythrozyten-Folat stieg um 399% auf 1103,6 ng/mL. Die tHcy-Werte hingegen sanken durch die Supplemente um 75% auf 13,0 $\mu\text{mol/L}$ (Abb. 1.) Nach Supplementation mit L-5-MTHF und PGA blieben sowohl die Holo-TC II-Werte als auch die Serum-B₁₂-Spiegel (Abb. 2) unbeeinflusst.

Methoden

Randomisierte, doppelblinde Interventionsstudie bei spanischen Heimbewohnern ($n = 94$, mittleres Alter $81,2 \pm 7,9$ Jahre, 37 Männer, 57 Frauen) mit subklinischem Vitamin B₁₂-Mangel. Zu Beginn, nach 14-tägiger Gabe von L-5-MTHF (10,4 mg/d) und nach 14-tägiger PGA-Gabe (10 mg/d) erfolgte eine Untersuchung der folgenden Blutparameter: Erythrozyten-Folat, Serumfolat, Holo-Transcobalamin II (Holo-TC II), Serum-B₁₂ und tHcy.

Schlussfolgerungen

Die Daten zeigen, dass die Folsäurederivate (L-5-MTHF und PGA) sichtbare Effekte auf den tHcy-Spiegel haben und sich dabei nicht in der Supplementform unterscheiden. Auswirkungen der Supplemente auf Serum-B₁₂-Werte und Holo-TC II-Spiegel konnten nicht gezeigt werden. Ob eine langfristige Gabe von Folsäure den Vitamin-B₁₂-Status beeinflusst, muss zukünftig gezeigt werden.

Zielsetzung

Ziel der Studie war es, die Auswirkungen der Folsäurederivate Pteroylmonoglutaminsäure (PGA) und L-5-Methyltetrahydrofolat (L-5-MTHF) auf Parameter des Vitamin B₁₂- und tHcy-Status spanischer Heimbewohnern zu untersuchen.

Parameter	Baseline	Nach L-5-MTHF-Gabe	Nach PGA-Gabe
Vitamin B ₁₂ (pmol/L)	232,0 \pm 112,8	246,8 \pm 127,9	234,7 \pm 114,4
Holo-TC II (pmol/L)	73,0 \pm 71,0	68,0 \pm 41,8	74,5 \pm 58,4
Serumfolat (ng/mL)	6,7 \pm 6,4	34,0 \pm 27,8	57,2 \pm 62,0
Erythrozyten-Folat (ng/mL)	276,7 \pm 197,1	710,4 \pm 516,7	1103,6 \pm 732,6
Gesamt-Homocystein ($\mu\text{mol/L}$)	17,3 \pm 5,5	13,0 \pm 3,8	13,0 \pm 3,9

Tabelle 1: Blutparameter zu den verschiedenen Zeitpunkten (MW \pm SD)

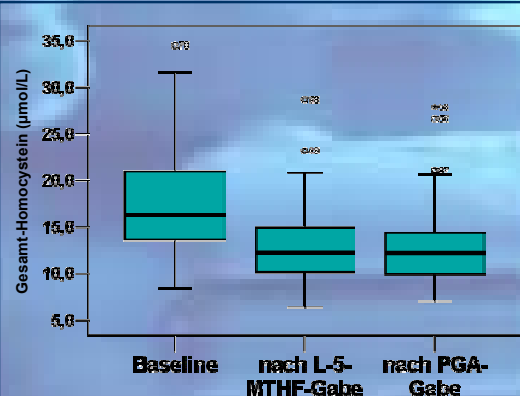


Abbildung 1: Vergleich der tHcy-Werte anhand der verschiedenen Supplementgaben. Signifikante Senkung der Werte nach L-5-MTHF-Gabe ($p \leq 0,001$).

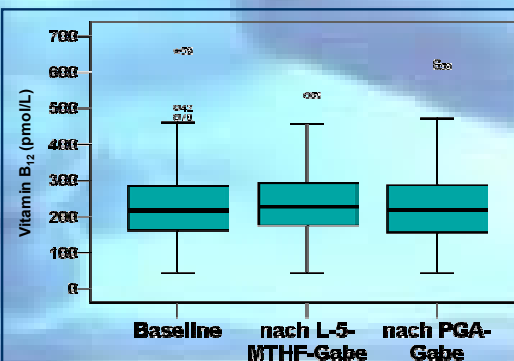


Abbildung 2: Vergleich der Vitamin B₁₂-Werte nach verschiedenen Supplementgaben

*Mit finanzieller Unterstützung des Spanischen Gesundheitsministeriums (FIS PI021830). Axis-Shield (Oslo, Norway) hat die Holo-TC RIA Reagenzienkit zu Verfügung gestellt. Merck Eprova AG die L-5-MTHF Supplemente. Frau R Arcas, Frau P. Carazo und Frau R. Pérez danken wir für ihre Hilfe.