

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Interazioni geni e ambiente:
folati e malformazioni congenite**

A cura di
Alberto Mantovani (a), Anna Velia Stazi (a) e Domenica Taruscio (b)

*(a) Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia
(b) Laboratorio di Ultrastrutture*

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

02/26

Istituto Superiore di Sanità

Interazioni geni e ambiente: folati e malformazioni congenite.

A cura di Alberto Mantovani, Anna Velia Stazi e Domenica Taruscio
2002, 67 p. Rapporti ISTISAN 02/26

La carenza e/o le alterazioni del metabolismo dei folati sono complessi eventi multifattoriali che vanno valutati dal punto di vista nutrizionale, tossicologico, clinico-patologico e genetico. Un adeguato apporto di acido folico, la forma stabile dei folati, è un importante fattore di prevenzione per il rischio di malformazioni congenite, principalmente difetti del tubo neurale e labiopalatoschisi. L'acido folico viene sia sintetizzato dalla flora intestinale che assunto tramite gli alimenti, soprattutto vegetali. Tale vitamina contribuisce a controllare la produzione endogena di omocisteina; grande interesse stanno riscuotendo alcuni polimorfismi di enzimi associati al metabolismo dei folati (ad esempio, metiltetraidrofolato-reduttasi). Accanto alla suscettibilità genetica, occorre considerare altri fattori, come stati patologici (ad esempio, malattia celiaca) o xenobiotici (alcuni farmaci e contaminanti ambientali) che possono interferire con i folati. È opportuno pertanto prendere in esame l'utilità di una integrazione di acido folico per la donna in età fertile, soprattutto per i soggetti potenzialmente più vulnerabili. Per coordinare l'attività di prevenzione, presso l'Istituto Superiore di Sanità è stato attivato il Centro Nazionale Malattie Rare in cui hanno particolare rilievo i programmi rivolti alle malformazioni congenite associate alla carenza e/o ai difetti del metabolismo dei folati.

Parole chiave: Folati, Ambiente di Vita, Genetica, Malformazioni, Gravidanza, Xenobiotici

Istituto Superiore di Sanità

Gene-environment interactions: folates and congenital malformations.

Edited by Alberto Mantovani, Anna Velia Stazi and Domenica Taruscio
2002, 67 p. Rapporti ISTISAN 02/26 (in Italian)

The deficiency and/or alterations of folate metabolism are complex multifactorial events, which have to be evaluated considering nutritional, toxicological, clinical and genetic aspects. An adequate intake of folic acid (the most stable form of folates) is an important factor to prevent the risk of birth defects, mainly neural tube defects and orofacial clefts. Folic acid is either synthesized by the gut flora and absorbed through foods, mostly vegetables. The vitamin contributes to control the endogenous production of homocysteine; there is great interest toward several polymorphisms of enzymes associated with folate metabolism (e.g., methyltetrahydrofolate reductase). Besides genetic susceptibility, attention should be given to other factors such as health disturbances (e.g., coeliac disease), or xenobiotics (e.g., some drugs and environmental contaminants) which may interfere with folates. Therefore, an integration of folic acid should be considered carefully for women in fertile age, particularly for subjects potentially more vulnerable. In order to co-ordinate the activities of prevention, the National Centre for Rare Diseases was established at the Istituto Superiore di Sanità (the Italian National Institute of Health). The Centre programmes give a special emphasis to the activities aimed at birth defects associated to the deficiency and/or altered metabolism of folates.

Key words: Folates, Living environment, Genetics, Birth defects, Pregnancy, Xenobiotics

Per informazioni su questo documento scrivere a: alberto@iss.it

Si ringrazia Natalia Mancino per l'importante contributo nella elaborazione di questo rapporto e Giovanna Morini per il lavoro di *editing*.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it/pubblicazioni.

INDICE

Introduzione <i>Alberto Mantovani, Anna Velia Stazi, Domenica Taruscio</i>	1
Assunzione di folati nella dieta italiana <i>Emilia Carnovale</i>	3
Fattori di rischio per la carenza di folati in gravidanza <i>Guido Cocchi, Elisa Mazzoni</i>	13
Malassorbimento di micronutrienti e malattia celiaca in gravidanza <i>Anna Velia Stazi</i>	25
Xenobiotici e folati <i>Alberto Mantovani</i>	32
Schisi orofacciali e genetica dei folati <i>Michele Rubini</i>	38
Fattori metabolici di rischio per malformazioni congenite e sindrome di Down: il ruolo dell'omocisteina <i>Iris Scala, Roberto Brancaccio, Generoso Andria, Gianfranco Sebastio</i>	52
Le malattie rare e le malformazioni congenite: strategie in sanità pubblica. Iniziative del Centro Nazionale Malattie Rare <i>Domenica Taruscio, Antonella Allegritti, Paolo Salerno, Moges Seyoum Ido</i>	59
Conclusioni <i>Alberto Mantovani, Anna Velia Stazi, Domenica Taruscio</i>	66

INTRODUZIONE

Alberto Mantovani (a), Anna Velia Stazi (a), Domenica Taruscio (b)

(a) *Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia*

(b) *Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Questo rapporto nasce dall'esigenza di valutare la carenza e/o le alterazioni del metabolismo dei folati come complessi eventi multifattoriali nella donna in gravidanza dai punti di vista nutrizionale, tossicologico, clinico-patologico e genetico. Questi problemi sono stati affrontati nel corso del workshop multidisciplinare "Interazioni geni-ambiente: folati e malformazioni congenite" svoltosi presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) il 7 dicembre 2001, di cui il rapporto raccoglie e sviluppa gli interventi.

L'acido folico (AF) o acido pteroilglutammico è una vitamina del gruppo B, la vitamina B9; viene coinvolto nella biosintesi delle purine e nell'introduzione di un gruppo metilico, nell'anello delle pirimidine essenziali per la produzione di DNA e di RNA, quindi i tessuti in fasi proliferative e di differenziazione sono maggiormente sensibili alle alterazioni metaboliche dei folati come quelli embrionali. Il 20% di AF, che non viene sintetizzato dall'organismo, deve essere assorbito giornalmente con la dieta, il rimanente viene prodotto dalla flora batterica intestinale. I cibi più ricchi di tale vitamina sono i vegetali a foglie verdi come gli spinaci, la frutta come le arance e il pompelmo, i fagioli, le arachidi, i germi di grano e di mais, il lievito di birra e il fegato; tuttavia, va considerato che la cottura distrugge circa il 90% della vitamina contenuta negli alimenti. Il fabbisogno giornaliero per gli individui sani è di circa 0,2 mg; durante la gravidanza il fabbisogno giornaliero raddoppia (0,4 mg), visto che il feto attinge dalle risorse materne per il proprio sviluppo. L'AF riveste un ruolo importantissimo nelle prime fasi dello sviluppo embrionale; una sua carenza nelle donne nelle prime fasi di gravidanza aumenta fortemente il rischio di malformazioni, in particolare di difetti del tubo neurale (DTN), soprattutto anencefalia (A) e spina bifida (SB). Inoltre, vanno considerate anche altre malformazioni tra cui le labiopalatoschisi (LPS); più in generale è possibile riscontrare un rischio più alto di esiti avversi in gravidanza quali ritardo di crescita intrauterina e lesioni placentari.

Per quanto riguarda l'apporto della vitamina B9 in gravidanza è importante tenere presente che il tubo neurale si chiude fra il 17° e 29° giorno dal concepimento; per questo, ai fini della prevenzione delle malformazioni congenite, è indispensabile un'assunzione adeguata e, ove necessaria, l'integrazione di AF. Quest'ultima dovrebbe iniziare almeno un mese prima del concepimento, anche se questo è difficile da attuare in pratica, per continuare poi per due o tre mesi.

È interessante osservare che l'incidenza dei DTN varia da una popolazione all'altra; nel nostro Paese si stima che nascono ogni anno circa 100-200 bambini affetti da SB, mentre l'incidenza è nettamente maggiore nei Paesi anglosassoni. Dal momento che in gravidanza non è semplice soddisfare il fabbisogno giornaliero di vitamina B9 solo con l'alimentazione, diventa importante il ricorso a integratori. Nel 1998 la Food and Drug Administration (l'organismo federale statunitense per la sorveglianza sui farmaci e sugli alimenti) ha disposto l'aggiunta di AF ad alcuni alimenti come le farine.

Ci sono poi alcuni fattori che possono aumentare il fabbisogno e/o ridurre l'assorbimento di AF, fra cui alcuni farmaci (barbiturici, antinfiammatori non steroidei), un elevato consumo di alcool, il diabete mellito insulino-dipendente, il malassorbimento causato da alcune patologie

come la malattia celiaca o alcune specifiche varianti di geni coinvolti nel metabolismo dei folati (metilene-tetraidrofolato-reduttasi, recettori dei folati).

Da questa descrizione generale sull'AF si comprende la necessità di analizzare questa vitamina nel suo complesso di interazioni con fattori di suscettibilità genetica e con i fattori di rischio ambientali. Inoltre, tali interazioni vanno considerate secondo le diverse discipline scientifiche nei riguardi della donna in età fertile al fine di tutelare, con attenta e adeguata prevenzione, sia la salute della donna che del concepito.

ASSUNZIONE DI FOLATI NELLA DIETA ITALIANA

Emilia Carnovale

Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN), Roma

Acido folico (AF o acido pteroilmonoglutammico) e folati vengono spesso usati come sinonimi, preferendo generalmente la prima definizione. In effetti folati è il termine generico per indicare tutti i composti con attività vitaminica che funzionano nelle reazioni di trasferimento dell'unità monocarboniosa nel metabolismo degli acidi nucleici e degli aminoacidi e che esistono in forme chimiche diverse. L'AF (Figura 1) è la più ossidata e stabile forma di folati; si trova raramente negli alimenti come tale, è il composto di sintesi utilizzato nella fortificazione degli alimenti e il più frequente nei supplementi vitaminici. I vari vitameri, o composti con attività vitaminica, differiscono per il grado di riduzione dell'anello della pteridina nelle posizioni 5, 6, 7, 8, per il tipo di unità monocarboniosa legata nelle posizioni 5 e 10 e per il numero di residui di glutammato.

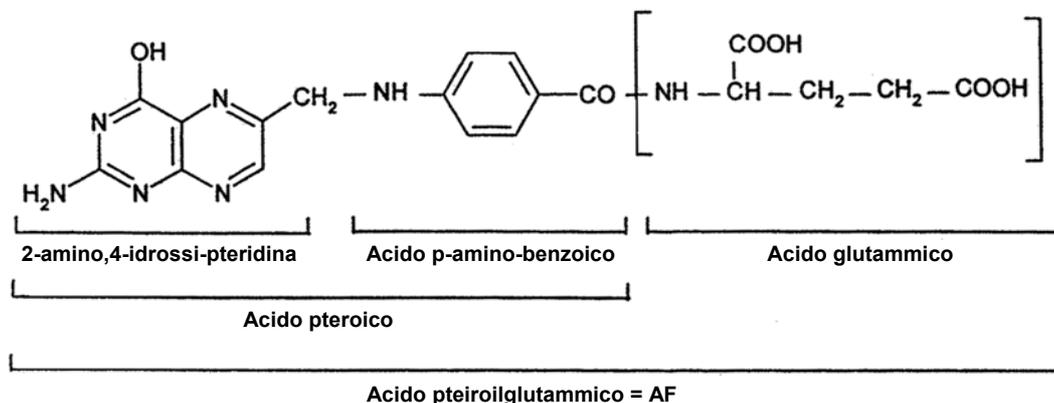


Figura 1. Struttura dell'AF

Negli alimenti si possono trovare i diversi derivati dei folati; la maggior parte sono pteroilpoliglutammati che contengono da 1 a 6 molecole di glutammato e i vari vitameri sono variamente distribuiti nei diversi gruppi di alimenti. Le forme più frequenti sono il 5-metiltetraidrofolato, il 5-formiltetraidrofolato e il tetraidrofolato.

I dati attualmente disponibili sul contenuto dei singoli vitameri negli alimenti non sono numerosi perché la loro estrazione e successiva separazione e quantificazione mediante High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) richiede protocolli specifici sia per i vari alimenti che per i vari vitameri in essi presenti e che pertanto non possono essere di generale applicazione (1-3). L'applicazione di tali metodiche è seguita di solito solo in studi specifici mirati al comportamento dei singoli vitameri in un alimento o gruppo di alimenti, all'effetto di singoli processi o ovviamente a studi di assorbimento.

Per la caratterizzazione degli alimenti finalizzata alla conoscenza e quantificazione di tutti i composti con attività vitaminica presenti (quali sono i dati riportati nelle tabelle di composizione degli alimenti), si preferisce determinare globalmente tutti i composti con attività

vitaminica mediante metodo microbiologico per il quale sono state recentemente definite e standardizzate le condizioni di estrazione, sono stati individuati i ceppi di microrganismi più idonei e sono stati preparati adeguati standard certificati di riferimento (4-6). *Ring test* al riguardo sono stati condotti nell'ambito del Progetto del V Programma Quadro dell'Unione Europea (UE) "Folate: from food to functionality and optimal health".

I folati sono variamente distribuiti negli alimenti sia di origine animale che vegetale. Sono presenti in latte e derivati, in carni e derivati e nei prodotti della pesca; comunque le fonti quantitativamente più interessanti sono sempre costituite da vegetali. Nella Tabella 1 è riportato, a titolo di esempio, il loro contenuto in alcuni alimenti particolarmente ricchi. I valori si riferiscono ai folati totali determinati con metodo microbiologico.

Situazione in Italia riguardo ai folati negli alimenti

In Italia non è vigente una normativa per la fortificazione obbligatoria degli alimenti come negli USA (come azione preventiva nei confronti dei difetti del tubo neurale, DTN), ma esiste solo una fortificazione volontaria adottata da alcune industrie alimentari. In Italia sono presenti sul mercato solo alcuni alimenti fortificati come cereali da colazione prodotti da industrie multinazionali, succhi di frutta, un latte speciale UHT e pochi altri prodotti di non larga diffusione. La nostra alimentazione di tipo mediterraneo è particolarmente ricca di alimenti noti per essere una buona fonte di folati come rappresentato dai dati INRAN prodotti in Tabella 1.

Tabella 1. Alimenti ricchi in folati

Alimenti	mcg/100 g		mcg/100 g
Ortaggi			
Carciofi, cuori lessati	155	Spinaci surgelati, lessati	90
Asparagi, punte lessati	155	Fagiolini lessati	57
Indivia, cruda	140	Cavolfiore bollito	51
Cavolini di Bruxelles lessati	110	Pomodori, pachino	40
Bieta lessata	110	Patate lessate	26
Broccoli, verdi, lessati	89		
Frutta fresca e frutta secca			
Arance	40	Nocciole	72
Fragole	30	Noci	66
Pompelmi	26	Pistacchi	58
Clementine	26	Mandorle	48
Legumi			
Piselli surgelati lessati	47	Fagioli borlotti, secchi, lessati	39
Ceci secchi, lessati	45	Lenticchie lessate	30

In Italia non esistono molti dati aggiornati sulla composizione degli alimenti comunemente consumati. Molteplici, sono invece, gli studi sui folati che indagano sui rapporti tra assunzione di folati e loro ruolo certo o presunto in relazione a numerose patologie.

Non esiste ancora in Italia una banca dati sul contenuto in folati degli alimenti comunemente consumati. Le tabelle italiane di composizione degli alimenti pubblicate dall'INRAN (7), che danno un quadro per quanto possibile aggiornato degli alimenti consumati in Italia, non

contengono ancora la sezione relativa ai folati; ma intenso lavoro è svolto in questa direzione per cui molti dati sugli alimenti di maggiore interesse sono già disponibili ed è in corso di completamento un opuscolo per dare indicazioni sulle strategie per incrementare l'apporto di folati con gli alimenti.

È stato pubblicato nel 1998 dall'Istituto Europeo di Oncologia una "Banca dati di composizione degli alimenti per studi epidemiologici in Italia" (8) con dati esclusivamente bibliografici; i dati per i folati sono derivati dalla banca dati dell'USDA (United States Department of Agriculture) e dalle tabelle inglesi Mac Cance and Widdowson. Tutti questi dati sono oggetto di revisione e aggiornamento a cura dell'INRAN.

Assunzione di folati con la dieta in Europa e in Italia

In Europa i dati esistenti sull'apporto in folati con la dieta sono scarsi, spesso problematici e di difficile confronto, situazione peraltro analoga a quella di altri Paesi. Alla prima rassegna condotta da de Bree *et al.* (9), è seguita quella condotta nell'ambito del Progetto "Folate: from food to functionality and optimal health" e i dati sono riportati nella Tabella 2 dalla quale risulta l'eterogeneità relativamente al metodo di indagine seguito, all'età e al numero dei soggetti (9). Per la valutazione dell'apporto viene seguita o la determinazione analitica sulla dieta ricostruita oppure il calcolo attraverso la traduzione del consumo di alimenti ricorrendo alle banche dati che, come già detto, per quanto riguarda i folati sono spesso problematiche per la carenza di dati analitici aggiornati e specifici per i vari Paesi.

Tabella 2. Assunzione di folati in Europa in mcg/die

Nazione	Media	Uomini	Donne	Fascia d'età	Soggetti n.	Metodo
Spagna	273	—	—	65-90	695	—
Finlandia	—	303	240	—	—	Diario giornaliero
	—	275	230	—	643	Diario giornaliero
Paesi Bassi	—	325	270	29-49	444	Diario 3 giorni
Regno Unito	—	307	253	> 65	2197	Diario 4 giorni
	—	312	219	16-64	—	Diario 7 giorni
Svezia	—	232	217	18-74	1215	Diario 7 giorni
Germania	—	—	228,5 (mediana)	18-40	1244	Diario 4 settimane precedenti
	—	277	209	15-18	141	Diario 3 giorni
	—	256	207	25-50	253	Diario 7 giorni
	—	274	225	51-64	108	—
Italia	214	—	—	—	—	Analisi della dieta
	268	—	—	—	—	—

Nella Tabella 3 vengono riportati più in dettaglio i dati disponibili per l'Italia.

I risultati del primo studio del 1991 (10), sono interessanti qualitativamente perché evidenziano una forte differenza in relazione all'area in studio e quindi alla qualità dei consumi, ma non sono validi da un punto di vista quantitativo perché la metodica microbiologica allora adottata, per il metodo di estrazione e per il tipo di microrganismo utilizzato, è poi risultata sottostimare notevolmente i risultati.

Tabella 3. Assunzione di folati in Italia

Popolazione	Campione	Metodo determinazione folati	Assunzione (mcg/die)	Commenti	Riferimenti bibliografici
1000 soggetti (25-55 anni): <i>area industrializzata del Nord Italia</i>	Analisi 10 diete maggiormente consumate	Microbiologico	82 ± 22	Individuazione deficienze marginali	(10)
300 soggetti (25-55 anni): <i>aree costiere del Sud Italia</i>	Analisi 10 diete maggiormente consumate	Microbiologico	161 ± 49	Individuazione deficienze marginali	(10)
10000 soggetti di provenienza: <i>nazionale Nord Ovest Nord Est Centro Sud e isole</i>	Dieta totale ricostruita	ELISA (Ridascreen)	248 268 224 246 251	Valutazione adeguatezza nutrizionale dieta italiana	(11)
	Dieta totale ricostruita	Microbiologico	214	Valutazione adeguatezza nutrizionale	(12)
3000 soggetti		Questionari multipli	287 ± 108	Valutazione adeguatezza nutrizionale	(13)
120 soggetti (18-60 anni) residenti nel Lazio		Diario aperto	150 ± 350	Effetto dei folati nella dieta sul livello di omocisteina plasmatica	INRAN*

* Roma, Università Cattolica Roma, Università Federico II Napoli (comunicazione personale)

Sulla base dei consumi rilevati dall'indagine nazionale sui consumi alimentari condotta dall'Istituto Nazionale della Nutrizione nel 1980-1984 è stato determinato, con l'approccio della dieta totale, un apporto medio a livello nazionale di 247 mcg/die, variabile a seconda delle aree geografiche da 224 a 268 mcg/die (11).

Nell'indagine successiva condotta nel 1994-1996 (10), in cui si è rilevata una generalizzata riduzione di consumi, è stato riscontrato, utilizzando sempre l'approccio della dieta totale ricostruita in laboratorio, un valore significativamente più basso, pari a 214 mcg/die. Tale dato è notevolmente diverso da quello calcolato sulla base della banca dati utilizzata per la traduzione dei consumi di alimenti in apporto di nutrienti, corrispondente a 287 mcg/die. Tale dato è in corso di revisione sulla base della revisione della banca dati per quanto riguarda la parte relativa ai folati.

È interessante comunque osservare che, considerando l'apporto percentuale di folati dai gruppi di alimenti, i cereali e derivati rappresentano una quota significativa, circa il 30% dell'apporto totale. Questa quota è più alta nelle diete di tipo continentale, che contengono tra

l'altro una più ampia percentuale di alimenti non raffinati, e questo può spiegare i più alti apporti in folati riscontrati in queste diete.

In due comuni dell'area del Chianti (Greve in Chianti e Bagno a Ripoli) è in corso uno studio epidemiologico che ha come obiettivo l'identificazione dei fattori di rischio che conducono alla disabilità con l'invecchiamento e che, tra i vari fattori, contempla il rilevamento degli apporti di folati su un campione di 1400 soggetti. Utilizzando un questionario alimentare messo a punto e validato nell'ambito dello studio European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition è stato rilevato un apporto in folati variabile tra 200 e 367 mcg al giorno (L. Ferrucci e B. Bartoli, dati non pubblicati).

Altro studio tuttora in corso, condotto dall'INRAN e dall'Università Cattolica di Roma, mirato a valutare l'effetto di diverse strategie di arricchimento della dieta per i folati, prevede tra l'altro il calcolo dell'apporto di folati su un campione di 120 soggetti adulti. I risultati sono in corso di elaborazione.

Importanza dei folati e raccomandazioni

Gli studi tendenti a chiarire il ruolo dei folati nella nutrizione sono crescenti; è oggi accertato che i folati hanno un ruolo causale nell'insorgenza di DTN, implicazioni nelle malattie cardiovascolari, nel cancro del colon e nei processi cognitivi (Alzheimer) (14-19).

Pertanto l'esigenza di rivedere e rivalutare i livelli raccomandati di assunzione è in atto in diversi Paesi.

Numerosi sono i fattori che intervengono nel determinare il fabbisogno in folati e che sono oggetto di approfondimento:

- la biodisponibilità dei folati negli alimenti, cioè la percentuale del contenuto determinabile analiticamente che viene utilizzata dall'organismo - la biodisponibilità dell'AF è del 100% (cioè viene totalmente utilizzato) per i folati contenuti negli alimenti, ma varia notevolmente a seconda del vitamero e dell'alimento (quindi delle interazioni nutriente/nutriente e delle interazioni con altri componenti dell'alimento) e mediamente è ritenuta del 50%;
- il polimorfismo genetico per le diverse varianti individuate, tra cui fondamentale il polimorfismo per la metilentetraidrofolato-reduttasi (MTHF-R);
- le interazioni folati-farmaci;
- il fumo.

Di conseguenza le raccomandazioni, cioè la quantità la cui assunzione è raccomandata giornalmente in relazione all'età, al sesso e allo stato fisiologico, variano al variare delle conoscenze scientifiche.

Nella Tabella 4 sono riportate le raccomandazioni italiane della Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU) (20), le Recommended Dietary Allowances (RDA) europee (21) e americane (22). È da sottolineare che le raccomandazioni italiane della SINU riprendono esattamente le indicazioni europee.

Esiste comunque una crescente tendenza ad aumentare i livelli contenuti nelle raccomandazioni nel periodo periconcezionale.

Tabella 4. Raccomandazioni per l'assunzione di folati

Fascia d'età	Europa (mcg/die)	Fascia d'età	USA-Canada (mcg/die)*
6-11 mesi	50	0-6 mesi	65**
1-3 anni	100	7-12 mesi	80**
4-6 anni	130	1-3 anni	150
7-10 anni	150	4-8 anni	200
11-14 anni	180	9-13	300
15-17 anni	200	14-18	400
<i>Adulti</i>	200	19- 30 anni	400
<i>Gravidanza</i>	400***	31-50 anni	400
<i>Allattamento</i>	350	<i>Adulti</i> 51-70 anni	400
		+70	400
		<i>Gravidanza</i> 4-50 anni	600
		<i>Allattamento</i> 14-50 anni	500

*Come equivalenti di folati da alimenti

** Adequate Intakes

***I DTN sono prevenuti da ingestione periconcezionale di 400 mcg di AF al giorno sotto forma di supplementi

Valutazione dello stato di nutrizione per i folati

Attualmente sono stati individuati alcuni indicatori dello stato di nutrizione per i folati (22).

Indicatore primario selezionato per determinare l'adeguatezza dei folati è il livello eritrocitario dei folati che riflette uno stato di nutrizione non immediato e transitorio ma stabile e precedente nel tempo. I folati infatti vengono assunti solamente dagli eritrociti in sviluppo del midollo osseo e non dagli eritrociti circolanti, maturi.

Il livello eritrocitario dei folati è quindi un indicatore dello stato a lungo termine. I valori dei folati plasmatici sono indicatori a breve termine dello stato di nutrizione e riflettono una situazione più vicina nel tempo.

Grande interesse esiste attualmente per i livelli di omocisteina plasmatica, che sono considerati fattori di rischio indipendente per le malattie cardiovascolari, e sono sempre negativamente correlati ai livelli di apporto di folati.

Per quanto riguarda l'Italia gli studi non sono molto numerosi e nelle Tabelle 5 e 6 sono riportati, estrapolando solo i dati relativi ai soggetti sani, i valori medi per i folati plasmatici, folati eritrocitari e l'omocisteina plasmatica.

Strategie perseguite per aumentare l'introito di folati

Le strategie perseguibili per aumentare l'assunzione di folati nella popolazione in generale, in gruppi specifici o in individui, possono seguire impostazioni diverse da scegliere tra la fortificazione, la supplementazione, l'incremento del consumo di alimenti ricchi in folati.

Negli USA, a differenza dell'Italia, come azione preventiva nei confronti dei DTN, è stata resa obbligatoria dal gennaio 1998 la fortificazione di tutti gli alimenti a base di cereali a un livello di 140 mcg di AF per 100 g di prodotto (29). Sono attualmente in corso le prime valutazioni per verificare l'effetto di tale strategia sia sull'assunzione di folati che sulla percentuale di DTN.

Tabella 5. Folati plasmatici ed eritrocitari in Italia

Soggetti	Metodo	Livelli plasmatici (nmoli/l)	Livelli eritrocitari (nmoli/l)	Riferimenti bibliografici
Campione 1 (57 anziani)	RIA	15,3 ± 7,3	–	(23)
<i>maschi</i>		13,5 ± 5,9	–	
<i>femmine</i>		16,8 ± 8,2	–	
Campione 2 (180 anziani) (due differenti città italiane)		14,6 ± 5,8	–	(23)
<i>maschi</i>		13,5 ± 4,0	–	
<i>femmine</i>		15,6 ± 7,0	–	
Donatori di sangue (20-60 anni:99 maschi e 102 femmine)	Dosaggio immunologico			(24)
<i>maschi</i>		10,7 ± 3,6	518 ± 190	
<i>femmine</i>		11,3 ± 3,0	458 ± 136	
Bambini (7-10 anni)	RIA			(25)
<i>maschi</i>		24,2	–	
<i>femmine</i>		23,3	–	

Tabella 6. Valori medi dei livelli plasmatici di omocisteina in Italia nei soggetti sani

Soggetti di controllo	Metodo di misura	Livelli di omocisteina plasmatica (nmoli/l)	Studio	Riferimenti bibliografici
121 soggetti (età media: 42 anni)	HPLC	7,83 ± 2,52	Associazione fra lieve iperomocisteinemia e malattie tromboemboliche in pazienti italiani	(26)
<i>maschi</i>		8,09 ± 2,60		
<i>femmine</i>		7,17 ± 2,12		
60 soggetti (età media: 35,8 ± 11,8 anni; 30 maschi e 30 femmine)	HPLC		Associazione fra moderata iperomocisteinemia e precoci patologie arterio-venose	(27)
<i>maschi</i>		13,2 ± 3,4		
<i>femmine</i>		10,0 ± 2,6		
183 soggetti		10,5 ± 4,6	Associazione con malattie infiammatorie intestinali	(28)

In diversi Paesi, come Canada, Australia e Nuova Zelanda e altri ancora, è ammessa la fortificazione volontaria di alimenti e pertanto sono presenti sul mercato alimenti fortificati il cui consumo non sembra avere inciso in maniera significativa sugli indicatori per lo stato di nutrizione di folati.

In Italia, come già detto, sono presenti sul mercato solo alcuni prodotti fortificati come ad esempio, un latte speciale UHT, succhi di frutta e cereali da colazione (prodotti da industrie multinazionali).

La fortificazione (volontaria o obbligatoria), prevede l'aggiunta di AF all'alimento e deve essere dichiarata in etichetta.

Per quanto riguarda i supplementi, i prodotti sono in continuo aumento e sono diversi sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo. Sono costituiti da solo AF o da altri derivati (come l'acido folinico) o possono essere costituiti da miscele vitaminiche.

La posizione dell'American Dietetic Association (30), che è quella condivisa dall'INRAN e dalle altre associazioni scientifiche in nutrizione, riguardo alla fortificazione degli alimenti e ai supplementi, è che la migliore strategia nutrizionale per promuovere un'ottima salute e ridurre il rischio di malattie croniche è scegliere saggiamente una larga varietà di alimenti. Aggiunte addizionali di vitamine (o minerali) da alimenti fortificati e/o supplementi possono aiutare alcuni individui in situazioni specifiche a raggiungere le raccomandazioni nutrizionali.

Studi in corso

È attualmente in corso, nell'ambito del V Programma Quadro dell'UE, un progetto "Folate: from food to functionality and optimal health", coordinato da P. Finglas a cui partecipano diversi partner europei, e comprende diverse azioni mirate essenzialmente a individuare le vie migliori per incrementare l'assunzione di folati tenendo conto dell'effetto di processi di trasformazione degli alimenti, dei meccanismi di assorbimento e di trasporto e di possibili effetti avversi.

In particolare, è in corso in Italia uno studio condotto dall'INRAN, dall'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma e dall'Università degli Studi di Napoli "Federico II" (coordinato rispettivamente da Emilia Carnovale, Pierpaolo Mastroiacovo, Generoso Andria) per valutare l'effetto di diverse strategie sull'abbassamento del livello di omocisteina plasmatica moderatamente elevata in individui sani adulti del Lazio. Le strategie seguite, tenendo conto anche del polimorfismo genetico per la MTHF-R, prevedono un confronto tra la dieta naturalmente arricchita in folati e due diversi tipi di supplementi, con durata dello studio di tre mesi.

Lo studio è ancora in corso ma dai primi risultati si può rilevare, oltre l'importanza del polimorfismo genetico nella modulazione della risposta sul livello dell'omocisteina plasmatica e dei folati eritrocitari e plasmatici, anche l'effetto positivo sugli stessi parametri della dieta naturalmente ricca di folati in confronto con i supplementi.

I dati ottenuti nello studio saranno interessanti per aumentare le conoscenze sui diversi aspetti riguardanti in Italia lo stato di nutrizione per i folati, dai livelli di folati nella dieta ai livelli dei diversi indicatori biochimici.

Ringraziamenti

Si ringraziano S. Ruggeri ed E. Camilli per la fattiva collaborazione nella raccolta di dati e nella stesura del manoscritto.

Bibliografia

- 1) Konings JM. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour. *JAOAC Int* 1999;82(1):119-27.
- 2) Ruggeri S, Vahteristo L, Aguzzi A, Finglas P, Carnovale E. Determination of folate vitamers in food ed in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography. *J Chromat A* 1999;855:237-45.
- 3) Forssén KM, Jägerstad MI, Wigerzt K, Witthöft C. Folate and dairy products: a critical update. *J Am Coll Nutr* 2000;19(2):100S-105.

- 4) Finglas PM, Wigertz K, Vahteristo L, Withoft C, Southon S, de Froidmont-Gortz I. Standardisation of HPLC techniques for determination of naturally-occurring folates in food. *Food Chem* 1999;64:245-55.
- 5) Tamura T. Microbiological assay of folates. In: Picciano MF, Stokstad ELR, Gregory JF (Ed.) *Folic acid metabolism in health and disease*. New York: Wiley, Liss, Inc; 1990. p. 121-37.
- 6) Whright AJ, Finglas PM, Southon S. Erythrocyte folate analysis:saponin added during lysis of whole folate concentrations depending on hemolysate pH. *Clin Chem* 2000;46(12):1978-86.
- 7) Carnovale E, Marletta L (Ed.). *Tabelle di composizione degli alimenti*. Roma: Istituto Nazionale della Nutrizione; 2000.
- 8) Salvini S, Parpinel M, Gnagnarella P, Maisonneuve P, Turrini (Ed.). *Banca dati di composizione degli alimenti per studi epidemiologici in Italia*. Milano: Istituto Europeo di Oncologia. 1998.
- 9) de Bree A, van Dusseldorp M, Brouwer IA, van het Hof KH, Steegers-Theunissen RPM. Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. *Eur J Clin Nutr* 1997;51:643-60.
- 10) Adorisio S, De Siena E, Ingraio G, Santaroni GP. Dietary folic acid in two Italian population groups. *Ital J Food Sci* 1992;1:33-8.
- 11) Ruggeri S, Aguzzi A, Carnovale E. Utilizzazione di saggi immunoenzimatici (ELISA) per la determinazione dei livelli di acido folico in alimenti e diete. In: *Ricerche ed innovazioni del sistema agricolo*. Chiriotti editore; 1998. Vol II: p. 672-6.
- 12) Ruggeri S, Lombardi Boccia G, Aguzzi A, Carnovale E. Folate in Italian Total Diet. Is an increase desirable and which way? In: *Nutrition, thrombosis and cardiovascular diseases*. Rome (Italy), 17-19 novembre 1999. p. 36.
- 13) Turrini A, Saba A, Perrone D, Cialfa E, D'Amicis A. Food composition patterns in Italy: the INN-CA study 1994-1996. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:571-88.
- 14) Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong LYC, Gindler J, Hong SX, Correa, for the China-US Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. Preventing neural-tube defects with folic acid in China. *New Engl J Med* 1999;341:1485-90.
- 15) Brouwer IA, van Dusseldorp M, Thomas CMG, Duran M, Hautvast JC, Eskes TK, Steegers-Theunissen RP. Low-dose folic acid supplementation decreases plasma homocysteine concentrations: a randomized trial. *A J Clin Nutr* 1999;99:99-104.
- 16) Homocysteine lowering trialist collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 1998;316:894-8.
- 17) Young-In Kim. Folate and cancer prevention: a new medical application of folate beyond hyperhomocysteinemia and neural tube defects. *Nutr Rev* 2000;57(10):314-21.
- 18) Snowdon DA, Tully CL, Smith CD, Riley KP, Markesbery WR. Serum folate and severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun study. *Am J Clin Nutr* 2000;71(4):993-8.
- 19) Molloy AM, Scott JM. Folate and prevention of disease. *Public Health Nutr* 2001;4(2B):601-9.
- 20) Società Italiana di Nutrizione Umana. *Livelli di assunzione raccomandati di energia e nutrienti per la popolazione italiana*. 1996.
- 21) Reports of the scientific committee for food. *Nutrient and energy intakes for the European Community Commission of the European Communities*. 1993.
- 22) 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.
- 23) Euronut SENECA investigators. Nutritional status: blood vitamins A, E, B6, B12, folic acid and carotene. *Eur J Clin Nutr* 1991;45:63-82.
- 24) Cafolla A, Dragoni F, Girelli G, Tosti ME, Costante A, Pastorelli D, Bedogni G, Scott S. Folate status in Italian blood donors: relation to gender and smoking. *Haem* 2000;85:694-8.
- 25) Maiani G, D'Amicis A. Vitamin nutritional status in Italy. *Eur J Cancer Prev* 1997;6(suppl) S3-9.

- 26) De Stefano V, Zappacosta B, Persichilli S, Rossi E, Casorelli I, Paciaroni K, Chiusolo P, Leone AM, Giardina B, Leone G. Prevalence of mild hyperhomocysteinaemia and association with thrombophilic genotypes (factors V Leiden and prothombin G20210A) in Italian patients with venous thromboembolic disease. *Brit J Haem* 1999;106:564-8.
- 27) Fermo I, Vigano D'Angelo S, Paroni R, Mazzola G, Calori G, D'Angelo A. Prevalence of Moderate Hyperhomocysteinemia in Patient with Early-Onset Venous and Arterial Occlusive Disease. *Ann Intern Med* 1995;123(10):747-53.
- 28) Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Saibeni S, Martinelli I, Omodei P, Mannucci PM, de Franchis R. High prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with inflammatory bowel disease: a pathogenic link with thromboembolic complications? *Thromb Haemost* 1998;80:542-5.
- 29) Food and Drug Administration (FDA), USA. Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. *Federal Register* 1996;61(44):8781-97.
- 30) ADA Reports. Position of the American dietetic association: Food fortification and dietary supplements. *J Am Diet Ass* 2001;101:115-25.

FATTORI DI RISCHIO PER LA CARENZA DI FOLATI IN GRAVIDANZA

Guido Cocchi, Elisa Mazzoni

Istituto Clinico di Pediatria Preventiva e Neonatologia, Università degli Studi di Bologna

Acido folico e difetti del tubo neurale

Negli ultimi venti anni sono stati raggiunti importanti risultati nel campo delle conoscenze sulle possibili cause e soprattutto sulla prevenzione delle malformazioni congenite (MC) in relazione all'uso di acido folico (AF) o di folati, come tali o in complessi polivitaminici.

Il ruolo del deficit di folati sullo sviluppo degli embrioni di ratto era stato segnalato da Nelson nel 1960 (1). Hibbard e Smithells nel 1965 (2) avevano ipotizzato una possibile correlazione tra deficit di folati e malformazioni fetali, in particolare i difetti del tubo neurale (DTN).

Il ruolo preventivo dell'AF in epoca periconcezionale è stato quindi dimostrato da numerosi studi sia randomizzati che controllati non randomizzati e quindi successivamente con studi di tipo osservazionale (Tabella 1).

Tabella 1. Studi che dimostrano il ruolo preventivo dell'AF in epoca periconcezionale

Studi		
randomizzati	controllati non randomizzati	osservazionali
Laurence <i>et al.</i> , 1981 (3)	Smithells <i>et al.</i> , 1983 (6)	Mulinaire <i>et al.</i> , 1988 (7)
MRC, 1991 (4)		Mills <i>et al.</i> , 1989 (8)
Czeizel <i>et al.</i> , 1992 (5)		Milunski <i>et al.</i> , 1989 (9)
		Bower et Stanley 1989 (10)
		Werler <i>et al.</i> , 1993 (11)
		Berry <i>et al.</i> , 1999 (12)

Fondamentali sono stati gli studi di Laurence *et al.* nel 1981 (3) e di Smithells *et al.* nel 1980 (13), 1981 (14) e 1983 (6), che, per primi negli anni '80, hanno condotto studi randomizzati e studi controllati non randomizzati sul ruolo dell'AF nella prevenzione primaria dei DTN.

In particolare nello studio, randomizzato a doppio cieco, di Laurence del 1981 (3), condotto su un campione di donne con un precedente figlio affetto da DTN, in cui un gruppo di donne (n. 60) assumeva 4 mg di AF e un altro (n. 51) placebo, dimostrava differenze significative nella ricorrenza dei DTN tra i due gruppi, soprattutto se si teneva conto della dieta povera o adeguata di folati. Infatti non ci fu ricorrenza nelle 84 donne con dieta adeguata, mentre le 6 ricorrenze furono tra le 27 donne con dieta povera (3).

Per la prima volta venne dimostrato come la fortificazione della dieta materna con AF, prima del concepimento, fosse associata a una significativa diminuzione del rischio di ricorrenza di DTN in famiglie con un precedente figlio affetto. Tutto questo non senza suscitare, negli esperti

e soprattutto negli organismi sanitari competenti, perplessità e scetticismi: il passaggio dagli studi controllati a una reale azione di politica sanitaria non fu immediato.

In seguito trial clinici (Medical Research Council - MCR - Vitamin Study Research group, 1991 (4)) e studi più ampi, come quello ungherese che considerò anche madri senza precedenti figli con DTN (Czeizel AE, 1992 (5)), riscontrarono ancora una volta un nesso di causalità fra AF e rischio di malattia: effettivamente la somministrazione prima e durante la gravidanza di questa vitamina riduceva non solo la ricorrenza, ma anche l'occorrenza di queste anomalie di sviluppo (Smithells RW, 1983 (6); Mulinare J, 1988 (7); Shaw GM, 1995 (15)) che potevano essere prevenute anche fino al 70% dei casi. Così la carenza di AF e di altre vitamine nella dieta della madre e, si scoprì in seguito, anche l'esposizione materna a sostanze antagoniste dei folati furono presi in considerazione come importanti fattori di rischio. Si prospettò quindi la grande opportunità di prevenire spina bifida (SB) e anencefalia (A) incrementando l'assunzione di AF.

Negli Stati Uniti vennero sviluppati, con il coinvolgimento di organismi governativi, programmi di salute pubblica quali l'aggiunta di folati negli alimenti di largo consumo, come ad esempio, l'arricchimento della farina, per avere la certezza che le donne in età fertile assumessero dosaggi più efficaci per lo scopo preventivo che ci si proponeva. Infatti non sempre si raggiungono livelli adeguati di folati coi soli alimenti naturali. Tali livelli raccomandati di folati secondo vari studi (Vergel RG, 1990 (16); Mulinare J, 1988 (7); Bower C, 1989 (10); Mills JL, 1989 (8); Milunsky A, 1989 (9)), si aggirano attorno a 0,4 mg/die (almeno per le donne che non hanno mai avuto un figlio affetto): i Centres for Disease Control and Prevention americani (CDC) hanno stimato che se tutte le donne seguissero le raccomandazioni fornite ci sarebbero ogni anno dalle 2000 alle 3000 gravidanze in meno gravate da SB e difetti correlati. Le difficoltà sono dovute non soltanto agli ostacoli incontrati dalle campagne informative nello sviluppare una reale presa di coscienza del problema negli strati sociali più bassi della popolazione (che sono quelli più a rischio), ma anche al fatto che i folati naturali assunti con la dieta non sono prontamente assorbibili come l'AF di sintesi: è l'elemento di sintesi infatti che si è dimostrato avere gli effetti preventivi sulla comparsa dei DTN, fornendo la vitamina in forma più biodisponibile (Erikson JD, 1995 (17)). Si è calcolato però che la supplementazione vitaminica di farina, pane e cereali aggiunge alla dieta materna una quota non superiore a 0,1 mg e che solo una piccola parte, forse un 2,5% in più, delle donne in età fertile, assumerà i livelli raccomandati e cioè 0,4 mg/die suggeriti quale risultato di una dieta a base di cibi preparati con la farina arricchita (Klein NW, 1996 (18)).

Alla luce di questi ulteriori risultati sembra preferibile, a tutt'oggi, la strategia di somministrazione di integratori/vitaminici alle donne che stanno programmando una gravidanza, potendo così aumentare di molto le quote assunte specie nel periodo periconcezionale.

Nel frattempo, dal momento che non è sempre possibile programmare una gravidanza, soprattutto nei Paesi a rischio dove il basso livello socio-economico spesso corrisponde a una cultura della "non programmazione", l'aggiunta di folati ad alimenti di largo consumo e le campagne di informazione volte a raccomandare una dieta ricca di vegetali a foglia verde e di altri vegetali (che contengono naturalmente la vitamina) sembra essere una buona strategia da parte della sanità pubblica per prevenire i DTN (Tabella 2).

Tabella 2. Fonti di rifornimento alimentare di AF

Categoria alimentare	Fonte di rifornimento			
	ottima (> 0,1 mg/portata)	buona (0,05-0,1 mg/portata)	discreta (0,015-0,05 mg/portata)	scarsa (< 0,015 mg/portata)
Pane e cereali	cereali arricchiti*		farina, pasta e riso integrali, pane bianco arricchito, avena, crusca	cereali non arricchiti, riso brillato, pane bianco
Frutta		succo d'arancia e di pompelmo, avocado, anacardi	frutta fresca, noci, nocciole, mandorle	
Verdura	asparagi, bietola, cavolfiore, cavolini di bruxelles*, fagioli	fagiolini, broccoli, lattuga, piselli, ceci, soia	verdura fresca e cotta	lenticchie
Cibi proteici		rene, manzo	salmone, uova	pesce, carne
Latticini			latte, yogurt, formaggi	

* Fonti particolarmente ricche di AF

L'AF, quindi, partecipa alla patogenesi dei DTN, anche se non si tratta solo di semplice deficienza ma di un problema metabolico più complesso che potrebbe però essere corretto proprio con l'assunzione di folati: mentre queste anomalie possono essere il risultato finale di un gran numero di diversi fattori eziologici, è opinione comune che siano multifattoriali e forse di origine poligenica. L'influenza dei fattori dietetici può essere controllata a livello del DNA e probabilmente solo gli studi di genetica molecolare potranno aiutarci a interpretare il meccanismo che sta alla base della loro insorgenza (Byrne J, 1995 (19)).

Anche se il ruolo della suscettibilità genetica è ancora largamente inesplorato, le origini genetiche dei DTN vengono suggerite da diverse osservazioni: l'elevato rischio di ricorrenza, che è maggiore nelle aree ad alta incidenza rispetto a quelle a bassa incidenza; i tassi costantemente elevati in alcune popolazioni, come ad esempio, i Sikh nella Colombia inglese; e la prevalenza di soggetti affetti nel sesso femminile. Inoltre, i DTN si associano di frequente a sindromi genetiche come la sindrome di Meckel o quella di Waardenburg: anche questo dato suffraga l'ipotesi di una componente genetica (Byrne J, 1995 (19)).

L'AF è un cofattore nella biosintesi delle purine e delle pirimidine e quindi nella sintesi di DNA e RNA ed è coinvolto nel ciclo di metilazione che inizia dalla metionina e termina con l'omocisteina, fornendo gruppi metilici. Alcuni ricercatori pertanto si sono concentrati sullo studio del metabolismo omocisteina/metionina e sui geni che codificano per enzimi coinvolti nel metabolismo dei folati per tentare di identificare il meccanismo con il quale l'AF riduce il rischio di DTN. Fra tutti, lo studio del 5,10-metiltetraidrofolato-reduttasi (MTHF-R) ha dato i risultati più interessanti: questo enzima converte il 5,10-metiltetraidrofolato in 5-metiltetraidrofolato, la più importante forma circolante dei folati e il principale donatore di gruppi metilici per la metilazione dell'omocisteina in metionina. Quindi l'MTHF-R è l'enzima chiave per la regolazione delle concentrazioni plasmatiche di omocisteina e per il mantenimento di un adeguato pool intracellulare di metionina.

Il polimorfismo del *locus* MTHF-R: C677T è stato il primo fattore di rischio genetico identificato per DTN. L'omozigosi per questo genotipo risulta un fattore di rischio non soltanto

per le madri ma anche per i figli (Van Der Put NM, 1998 (20)): l'eventualità della comparsa di DTN è molto maggiore se entrambi, madre e figlio, sono omozigoti per il genotipo mutato. Poiché però finora non è stato possibile osservare una stretta interazione fra assunzione materna di folati e genotipo fetale, è verosimile che l'effetto protettivo della vitamina, in grado di aumentare l'attività dell'MTHF-R poco funzionante attraverso una sua stabilizzazione, riguardi la correzione del difetto metabolico materno piuttosto che di quello fetale. Un'alterazione nel metabolismo della madre potrebbe infatti colpire lo sviluppo del feto anche prima che il passaggio della metilazione dell'omocisteina venga attivato nel feto stesso.

In conclusione, quindi, anche dal punto di vista molecolare l'AF, probabilmente superando il blocco metabolico secondario alla mutazione dell'MTHF-R nei soggetti omozigoti, è in grado di svolgere un ruolo protettivo nei confronti della comparsa di DTN. Ulteriori studi e approfondimenti sono comunque ancora necessari per chiarire quale sia l'effettivo peso dell'ambiente e quale quello della suscettibilità genetica e del loro intrecciarsi nel determinare i DTN.

Acido folico e altre malformazioni congenite

Czeizel AE (1993) (21), in uno studio randomizzato suggerì un effetto protettivo dell'AF anche nei confronti di altre malformazioni congenite (MC). L'incidenza totale di MC era di 19,4‰ nel gruppo che assumeva polivitaminici contenenti AF, e di 35,5‰ nel gruppo che assumeva placebo. Questo risultato ha incentivato l'inizio di nuovi studi per testare l'ipotesi dell'uso periconcezionale di AF per diminuire il rischio di altre MC.

Acido folico e labiopalatoschisi

La labiopalatoschisi (LPS) è il tipo di malformazione più studiata, dopo i DTN, in relazione all'AF. Sembra avere un'ereditarietà multifattoriale, e molti studi hanno indicato che un insufficiente apporto di AF potrebbe essere correlato all'eziologia della LPS (Hayes C, *et al.*, 1996 (22)).

Inoltre, i DTN e la LPS sono correlati in quanto entrambi i suddetti apparati derivano dalle cellule delle creste neurali, che originano dalla plica dorso-laterale del tubo neurale e sono entrambi difetti della linea mediana, quindi possono essere presenti contemporaneamente (Khoury MJ, 1989 (23); Hayes C, 1996 (22)).

Molti studi (Tabella 3) furono svolti a partire dall'osservazione di Milunsky A, *et al.* (1968) (24), in cui donne che avevano assunto in gravidanza degli antagonisti dei folati (ad esempio, Metothrexato) avevano presentato figli affetti da LPS, con risultati un po' discordanti.

Lo studio di Tolarova M & Harris J, 1995 (25) utilizzò livelli molto alti di supplementazione di AF (10 mg) e i risultati positivi fecero supporre un effetto dose-dipendente dell'AF. In seguito però Shaw (Shaw GM, *et al.*, 1995 (26)) e Itikala (Itikala PR, *et al.*, 2001 (27)) dimostrarono l'effetto preventivo dei folati, senza un effetto dose-dipendente e Hayes (Hayes C, *et al.*, 1996 (22)) non dimostrò nessun effetto preventivo.

Nonostante queste discordanze nei risultati, molti studi ben condotti suggeriscono il ruolo preventivo dell'AF per le LPS, ed è perciò consigliabile l'assunzione da parte di donne in età fertile di AF o multivitaminici che lo contengano.

Tabella 3. Revisione di studi sull'effetto dell'AF nella LPS

Tipo di studio e informazioni su MV*/AF	Tipo di schisi°	Esposti (casi/ tutti i casi)	Non esposti (controlli/tutti i controlli)	Rischio	Riferimenti bibliografici
Prospettico non randomizzato (1977-80) Studio di ricorrenza MV+10 mg AF da 2 mesi prima del concepimento a 3 mesi dopo il concepimento	LPS	3/214	77/1901	0,34 (0,1-1,1)	(25)
Caso-controllo (1987-1988) MV+0,4-0,8 mg AF + cereali arricchiti da 1 mese prima a 2 mesi dopo il concepimento	LPS isolato LPS multipli PS isolato PS multipli Schisi a eziologia nota	184/286 55/79 89/122 46/66 28/54	499/734	0,5 (0,6-0,68) 0,61 (0,35-1,1) 0,73 (0,46-1,2) 0,64 (0,35-1,2) 0,68 (0,35-1,3)	(26)
Caso-controllo (1988-1991) MV+AF, dose sconosciuta	LPS PS Tutti i tipi di schisi	69/195 38/108 107/303	499/636	1,2 (0,7-2) 0,9 (0,5-1,7) 1,1 (0,7-1,6)	(22)
Caso-controllo 3-6 mg di AF	LPS PS	114/1246 coppie 173/537 coppie	154/1246 coppie 209/537 coppie	0,72 (0,55-0,92) 0,75 (0,58-0,96)	(28)

* MV: multivitaminici

° Tipi di schisi: labiopalatoschisi completa (LPS); labioschisi (LS); palatoschisi (PS)

Acido folico e cardiopatie congenite

Grazie a esperimenti su animali, negli anni '60 Monie e Nelson (29) scoprirono che l'AF aveva un effetto preventivo sui difetti cardiovascolari. Nello studio randomizzato ungherese (Czeizel AE, 1996 (30)) fu dimostrata una differenza significativa tra le cardiopatie congenite nel gruppo trattato con multivitaminici (9/2222) e il gruppo trattato con placebo (20/2153).

Dopo questo studio l'attenzione venne posta in particolare sulle cardiopatie troncoconali, che, come i DTN e le LPS, sono difetti della linea mediana. I numerosi studi condotti (Tabella 4) anche in questo caso hanno dato risultati discordanti, ma sembra che l'assunzione periconcezionale di AF abbia un effetto preventivo soprattutto sui difetti interventricolari e sulla trasposizione dei grossi vasi (Botto LD, *et al.*, 2000 (31)).

Acido folico e malformazioni genito-urinarie

Alcuni studi condotti su animali dimostrarono che il deficit di folati poteva determinare malformazioni genito-urinarie (Monie IW, *et al.*, 1954 (35); Monie IW, *et al.*, 1957 (36)). Inoltre, poiché l'apparato genito-urinario continua il suo sviluppo durante tutta la gravidanza, è sensibile all'apporto di AF per un lungo periodo di tempo (Maizels M, 1986 (37)).

Tabella 4. Revisione di studi sull'effetto dell'AF nelle cardiopatie congenite

Tipo di studio e informazioni su MV/AF	Tipo di cardiopatia	Esposti (casi/tutti i casi)	Non esposti (controlli/tutti i controlli)	Rischio	Riferimenti bibliografici
Caso-controllo (1987-1988) MV+0,4-0,8 mg AF + cereali arricchiti da 1 mese prima a 2 mesi dopo il concepimento	Trasposizione dei grossi vasi Tetralogia di Fallot Altri Cardiopatie troncoconali	125/207	326/481	0,70 (0,46-1,1)	(32)
Trial clinico randomizzato MV+0,8 mg AF	DIV* DIV+cardiopatie troncoconali Tutte le cardiopatie	2/2222 3/2222 9/2222	8/2153 10/2153 20/2153	0,24 (0,05-1,14) 0,29 (0,08-1,05) 0,43 (0,20-0,96)	(33)
Caso-controllo 3-6 mg di AF	Tutte le cardiopatie	1510/2976 coppie	1466/2976 coppie	0,86 (0,77-0,96)	(34)
Caso-controllo (1987-1989) MV+ apporto dietetico da 3 mesi prima del concepimento a 3 mesi dopo	Difetti dell'outflow Trasposizione dei grossi vasi DIV Tutte le cardiopatie	12/83 5/42 23/122 113/494	431/1610	0,46 (0,24-0,86) 0,38 (0,15-0,98) 0,61 (0,38-0,99) 0,76 (0,60-0,97)	(31)

* Difetto Interventricolare

La riduzione significativa del rischio di anomalie dell'apparato genito-urinario è stata poi dimostrata da altri studi (Tabella 5), in particolare in relazione all'assunzione periconcezionale di folati (Li DK, *et al.*, 1995(38)).

Tabella 5. Revisione di studi sull'effetto dell'AF nelle malformazioni genito-urinarie

Tipo di studio e informazioni su MV/AF	Tipo di difetto	Esposti (casi/tutti i casi)	Non esposti (controlli/tutti i controlli)	Rischio	Riferimenti bibliografici
Studio randomizzato controllato in doppio cieco MV+0,8 mg AF	Tutti i difetti dell'apparato genito-urinario	2/2222	9/2153	0,22 (0,05-0,99)	(30, 33)
Caso-controllo 3-6 mg di AF	Agenesia renale Rene multicistico	20/43 coppie 29/73 coppie	27/43 coppie 36/73 coppie	0,53 (0,23-1,26) 0,68 (0,35-1,31)	(34)
Caso controllo (1993-1996)	Tutti i difetti dell'apparato genito-urinario	43/117	142/367	0,14 (0,05-0,41)	(38)

Acido folico e difetti in riduzione degli arti

I difetti in riduzione degli arti possono derivare da fattori ambientali, e ciò è dimostrato dal notevole aumento di queste malformazioni in bambini nati tra il 1957 e il 1962 da madri che avevano assunto Talidomide. Studi condotti su animali dimostrarono l'effetto teratogeno sullo sviluppo degli arti di antagonisti dell'AF (Thersch JB, 1952 (39)).

Altri studi condotti in seguito (Tabella 6) dimostrarono un significativo effetto preventivo dell'AF sui difetti in riduzione degli arti, senza particolare indicazione per un tipo particolare di difetto.

Tabella 6. Revisione di studi sull'effetto dell'AF nei difetti in riduzione degli arti

Tipo di studio e informazioni su MV/AF	Tipo di difetto	Esposti (casi/tutti i casi)	Non esposti (controlli/tutti i controlli)	Rischio	Riferimenti bibliografici
Caso-controllo 3-6 mg di AF	Tutti i difetti	1/2222	5/2153	0,19 (0,02-1,7)	(33)
Caso-controllo (1987-1988) MV+0,4-0,8 mg AF + cereali arricchiti da 1 mese prima a 2 mesi dopo il concepimento	Longitudinali Trasversi "Known cause" Bande amniotiche Tutti i difetti	51/81 35/50 7/13 17/34 110/178	326/461	0,61 (0,34-1,1) 1,0 (0,45-2,4) 0,37 (0,10-1,4) 0,50 (0,20-1,3) 0,64 (0,41-1,0)	(32)
Caso-controllo (1968-1980) MV da 3 mesi prima a 3 mesi dopo il concepimento	Trasversi Longitudinali Altri Tutti i difetti	2/36 3/27 2/39 9/117	431/1179	0,30 (0,07-1,32) 1,03 (0,17-4,30) 0,26 (0,03-1,07) 0,47 (0,23-0,97)	(40)

Il progetto Biomed II

Il progetto Biomed II si è posto gli obiettivi di descrivere e confrontare, attraverso i diversi Paesi partecipanti, le politiche di salute pubblica attuate per la prevenzione primaria della SB e di altri DTN, e di valutare fino a che punto queste politiche sono state realizzate e correlarle all'andamento della prevalenza dei DTN in quegli stessi Paesi. Più specificamente, queste informazioni hanno fornito dati europei precisi utili nella valutazione dell'impatto che le strategie di prevenzione primaria hanno sul verificarsi dei DTN e, quegli stessi dati, costituiranno una base per programmare in futuro strategie più efficaci. L'interruzione di gravidanza in caso di eventuali difetti alla nascita è considerata, nei Paesi in cui è legale e largamente diffusa, una soluzione chiaramente insoddisfacente sia per le famiglie che per la società, soprattutto quando c'è la possibilità di realizzare una prevenzione primaria.

La ricerca scientifica ha stabilito da alcuni anni che metà di tutti i DTN possono essere prevenuti dall'uso, nel periodo periconcezionale, di complessi multivitaminici contenenti AF. Finora gli interventi di salute pubblica in questa direzione sono stati lenti e non uniformi e la loro efficacia è essenzialmente sconosciuta.

Gli obiettivi specifici di questa azione concordata sono riassumibili in quattro punti:

- ricercare le ragioni per le quali i Paesi, appartenenti e non alla Comunità Europea, lavorando a partire dagli stessi dati pubblicati, hanno adottato differenti politiche di intervento (o non l'hanno fatto) per la prevenzione primaria dei DTN attraverso l'uso di AF;
- determinare l'effettiva estensione con cui tali politiche (o la mancanza di queste) sono state realizzate;
- determinare l'andamento nel tempo della prevalenza dei DTN negli stessi Paesi in esame durante il periodo probabilmente influenzato da tali politiche (o l'assenza di queste);
- determinare se differenti strategie sono state associate a differenti orientamenti temporali della prevalenza dei DTN.

A eccezione del Portogallo e dell'Irlanda (registro Eurocat), i partecipanti alla Biomed Concerned Action sono membri della International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems (ICBDMS), una rete di registri nazionali o regionali delle anomalie congenite le cui attività di ricerca sono coordinate dall'International Centre for Birth Defect (ICBD), con sede a Roma e che costituisce anche il centro di riferimento dell'intero progetto.

La dimensione europea del progetto ha consentito di confrontare le modalità con cui vengono realizzati interventi e prese decisioni su una specifica questione nell'ambito dei sette stati membri: Finlandia, Francia, Irlanda, Italia, Olanda, Portogallo, Gran Bretagna e dei tre stati associati: Israele, Norvegia e Ungheria. Questo confronto ha permesso di identificare fattori nazionali che hanno portato a conclusioni diverse basate sugli stessi dati scientifici.

Un altro obiettivo è quello di confrontare i dati europei con quelli di Paesi extra-europei, in particolare gli Stati Uniti che sono stati il primo Paese a diffondere raccomandazioni e a proporre una metodologia di interventi di prevenzione primaria dei DTN. Tutto questo è stato attuato sotto il controllo del Metropolitan Atlanta Congenital Defects Program, membro anche questo dell'ICBDMS.

Sono state effettuate valutazioni sulla conoscenza dei folati, necessarie per determinare quanto la popolazione è consapevole del ruolo dell'AF nella prevenzione dei DTN e se esistono o meno interventi a livello nazionale in particolare su donne in età fertile o su sottogruppi selezionati di questa parte di popolazione. Variabili individuali aggiuntive come l'età, il livello di istruzione e la parità saranno correlate alla conoscenza dell'AF attraverso le *odds ratio* delle prevalenze.

I dati riguardanti i DTN sono stati normalmente raccolti, con le definizioni di caso standard. A causa dell'alto numero di casi di DTN diagnosticati prima della nascita, a cui fanno seguito le relative interruzioni di gravidanza, l'accertamento è stato completato dalla registrazione come aborti indotti, a eccezione dei Paesi nei quali è illegale.

Inoltre le conseguenze di differenti politiche sono state ricercate confrontando gruppi di programmi diversi per variabili che possono essere correlate con la prevenzione primaria dei DTN. Queste variabili includono: il tipo e il livello delle strategie di prevenzione primaria supportate dalla politica nazionale; l'efficacia della strategia piuttosto che la politica in sé, come stimato dai risultati delle valutazioni sulla conoscenza dei folati; la proporzione delle gravidanze programmate come indice di quella delle gravidanze passibili dell'uso di complessi multivitaminici prima del concepimento. Si avrà così un'idea precisa dell'ampiezza della popolazione a cui sono dirette le misure preventive per le anomalie congenite in Europa.

Conclusioni

Studi randomizzati hanno dimostrato che l'integrazione della dieta materna con supplementazione farmacologica di AF (da solo o come componente di un complesso multivitaminico) riduce del 50-70% il rischio di avere un figlio con un DTN. È stato dimostrato inoltre che questo approccio è efficace nella prevenzione sia dell'occorrenza che della ricorrenza di questi difetti (MRC 1991 (4); Czeizel AE, 1992 (5)).

L'effetto protettivo dell'AF non sembra limitato ai soli DTN ma può coinvolgere anche altre anomalie congenite quali la LPS, alcuni tipi di cardiopatie congenite, alcuni tipi di malformazioni dell'apparato genito-urinario e di difetti in riduzione degli arti. Quale sia la modalità precisa con cui il livello di folati, sia materno che fetale, condizioni il rischio di DTN non è tuttavia ancora completamente chiarito. Nonostante molte delle donne che hanno un figlio affetto da DTN non presentino generalmente livelli plasmatici più bassi di folati, quando valutati al termine della gravidanza, rispetto a quelli delle donne con un figlio non affetto, è stata dimostrata, invece, una riduzione del rischio di DTN associata ad aumentati livelli plasmatici di folati nei campioni di sangue prelevati nel corso del primo trimestre di gravidanza (Daly LE, *et al.*, 1995 (41)).

Nella popolazione generale il rischio di DTN mostra notevoli variazioni nel panorama internazionale (Clearinghouse 2001 (42)). Per spiegare almeno in parte queste differenze, le frequenze di queste apparenti suscettibilità genetiche nella popolazione dovrebbero differire fra i diversi Paesi, benché la relazione sia probabilmente condizionata da fattori ambientali, compresa la dieta, l'uso di supplementazioni e lo stile di vita. È quindi di fondamentale importanza mettere a confronto le diverse campagne di prevenzione attuate nei Paesi a incidenza diversa (Tabella 7).

Tabella 7. Raccomandazioni per l'utilizzo periconcezionale di AF in 11 Paesi

Paese	Raccomandazioni ufficiali			Raccomandazioni non ufficiali		
	Anno	Assumere supplementazioni	Aumentare i folati nella dieta	Anno	Assumere supplementazioni	Aumentare i folati nella dieta
Finlandia	1995	0,4 mg/die	sì	no	no	no
Francia	2000	0,4 mg/die	sì	1995 1997	0,2 mg/die 0,2 mg/die	sì
Ungheria				1993 1996	0,8 mg in MV 0,8 mg in MV	
Irlanda	1993	0,4 mg/die	sì	no		
Israele	2000	0,4 mg/die		no		
Italia	No			no		
Olanda	1993	0,5 mg/die	no	1989 1993	No 0,4 mg/die	sì sì
Norvegia	1993 1998	No 0,4 mg/die	sì	no		
Portogallo	1998	Non precisato	non precisato	no		
Regno Unito	1992	0,4 mg/die	sì	no		
USA	1992	0,4 mg/die (supplementi o dieta)		1998	0,4 mg + folati nella dieta	no

Il Progetto Biomed II valuta il ruolo protettivo dei folati nella prevenzione dei DTN e l'esistenza di interventi di sanità pubblica a livello nazionale. A tal fine si è proceduto alla somministrazione di un questionario, appositamente preparato, per un campione di donne ricoverate presso le Cliniche Ostetriche del Policlinico S. Orsola-Malpighi di Bologna nel periodo novembre 2000-febbraio 2001. Tale questionario, somministrato a 311 donne, scelte in modo random, ha permesso di raccogliere informazioni relative a: età materna, gravidanza e parità, livello di istruzione, consumo di sigarette, conoscenza degli effetti di AF e degli alimenti che ne sono ricchi, eventuale variazione della dieta durante la gravidanza per aumentarne l'apporto, eventuale assunzione di complessi multivitaminici o del solo AF con particolare riguardo al periodo di assunzione e al dosaggio.

Delle 311 donne intervistate solo 14 (pari al 4,5%) hanno assunto AF nel periodo periconcezionale.

Le considerazioni che si possono trarre dai profili di queste 14 donne riguardano soprattutto il ruolo chiave svolto dal ginecologo nell'informare le pazienti circa gli effetti preventivi dei folati e nello spiegare loro di quali patologie si può ridurre il rischio di insorgenza.

Non meno importante appare il livello culturale: è stata osservata infatti una diversa sensibilità al problema preventivo da parte delle donne provviste di laurea o un titolo di scuola media superiore (13/14 pari al 92,8%) rispetto a quelle con uno di scuola media inferiore. Altro dato significativo risulta l'età più "matura" delle donne in esame: quelle che hanno assunto l'AF in epoca periconcezionale sono risultate, a eccezione di 3, di età > 32 anni (11/14 pari al 78,6%). Infine non appare trascurabile la presenza nell'anamnesi di 6 delle 14 donne di una pregressa interruzione di gravidanza; questo dato insieme alle variabili titolo di studio ed età materna si correla verosimilmente alla necessità di una maggior presa di coscienza sui problemi che possono insorgere in una gravidanza e a quella di una programmazione della gravidanza stessa per motivi lavorativi e quindi la possibilità di assumere l'AF in epoca preconcezionale.

Il risultato che solo 4 donne su 100 sia a conoscenza di queste problematiche rispecchia in modo evidente la necessità di promuovere anche in Italia, come già si sta facendo da tempo e con buoni risultati in altri Paesi, campagne di informazione da condurre su scala nazionale dirette sia agli "addetti ai lavori" che a tutte le donne in età fertile e quindi non solo a quelle che programmano una gravidanza.

Bibliografia

- 1) Nelson MM. Congenital Malformations. London: Ciba Fnd Symp; 1960.
- 2) Hibbard BM, Smithells RW. Folic acid metabolism and human embryopathy. *Lancet* 1965;1:1254.
- 3) Laurence KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H. Double blind randomized controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural tube defects. *Br Med J*, 1981;282:1509.
- 4) Medical Research Council (MRC) prevention of neural tube defects: results of the vitamin study. MRC vitamin study research group. *Lancet* 1991;338:131-7.
- 5) Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Eng J Med* 1992;327:1832-5.
- 6) Smithells RW, Nevin NC, Seller MJ, Sheppard S, Harris R, Read AP, Fielding DW, Walker S, Schorah CJ, Wild J. Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defects recurrences. *Lancet* 1983;1:1027-31.
- 7) Mulinare J, Cordero JF, Erickson JD. Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects. *JAMA* 1988;260:3141-5.

- 8) Mills JL, Rhoads GG, Simpson JL, Cunningham GC, Conley MR, Lassman MR, Walden ME, Depp OR, Hoffman HJ. The absence of a relation between the periconceptual use of vitamins and neural tube defects. *N Engl J Med* 1989 150:613.
- 9) Mills JL, Rhoads GG, Simpson JL, Cunningham GC, Conley MR, Lassman MR, Walden ME, Depp OR, Hoffman HJ. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA* 1989;262:2847.
- 10) Bower C, Stanley FJ. Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in western Australia. *Med J Aust* 1989;150:613.
- 11) Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA. Periconceptual folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *JAMA* 1993; 269:1257-61.
- 12) Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong LY, Gindler J. Prevention of neural tube defects with folic acid in China. China-US. Collaborative project for neural tube defect prevention. *N Engl J Med* 1999;341:1485-90.
- 13) Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, Seller MJ, Nevin NC, Harris R, Read AP, Fielding DW. Possible prevention of neural tube defects by periconceptual vitamin supplementation. *Lancet* 1980;1:339-40.
- 14) Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, Seller MJ, Nevin NC, Harris R, Read AP, Fielding DW. Apparent prevention of neural-tube defects by periconceptual vitamin supplementation. *Arch Dis Child* 1981;56(12):911-8.
- 15) Shaw GM, Shaffer D, Velie E. Periconceptual vitamin use, dietary folate and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology*1995;6:219-26.
- 16) Vergel RG, Sanchez LR, Heredero BL, Rodriguez PL, Martinez AJ. Primary prevention of neural tube defects with folic acid supplementation: Cuban experience. *Prenat Diagn*, 1990;10:149.
- 17) Erikson JD. Primary prevention of neural tube defects (NTD) with folic acid. *Acta Paediatr Lat*, 1995;48:85-93.
- 18) Klein NW. Folic acid and prevention of spina bifida *JAMA* 1996;275:1636.
- 19) Byrne J, Cama A, Reilly M, Lavia N, Vigliarolo MA, Levato L, Boni L, Andreussi L. The epidemiology of neural tube defects. *Gaslini* 1995;27:138-44.
- 20) van Der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van Der Heuvel LP, Mariman EC, Den Heyer M, Rozen R, Blom HJ. Mutated methylentetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida *Lancet* 1995;346:1070-1.
- 21) Czeizel AE. Prevention of congenital abnormalities by periconceptual multivitamin supplementation. *BMJ* 1993;306:1645-8.
- 22) Hayes C, Werler MM, Willett WC, Mitchell AA. Case-control study of periconceptual folic acid supplementation and oral clefts. *Am J Epidemiol* 1996;143:1229-34.
- 23) Khoury MJ, Cordero JF, Mulinare J, Opitz JM. Selected midline defect association: a population study. *Paediatrics* 1989;84:266-72.
- 24) Milunsky A, Graef JW, Gaynor MF. Methotrexate induced congenital malformations. *J Paediatr* 1968;72:790-5.
- 25) Tolarova M, Harris J. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptual supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology* 1995;51:71-8.
- 26) Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, O'Malley CD, Tolarova MM. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptually. *Lancet* 1995;346:393-6.
- 27) Itikala PR, Watkins ML, Mulinare J, Moore CA, Liu Y. Maternal multivitamin use and orofacial clefts in offspring. *Teratology* 2001;63:79-86.

- 28) Czeizel AE, Timar L, Sakkozi A. Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Paediatrics* 1999;104:66.
- 29) Monie IW, Nelson MM. Abnormalities of pulmonary and other vessels in rat fetuses from maternal pteroylglutamic acid deficiency. *Anat Rec* 1963;147:397-401.
- 30) Czeizel AE. Reduction of urinary tract and cardiovascular defects by periconceptional multivitamin supplementation. *Am J Med Genet*, 1996;62:179-83.
- 31) Botto LD, Mulinaire J, Erickson JD. Occurrence of congenital heart defects in relation to maternal multivitamin use. *Am J Epidemiol* 2000;151:878-84.
- 32) Shaw GM, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ. Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *Am J Med Genet* 1995;536-45.
- 33) Czeizel AE. Periconceptional folic acid containing multivitamin supplementation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;78:151-61.
- 34) Czeizel AE, Toth M, Rockenbauer M. Population-based case control study of folic acid supplementation during pregnancy. *Teratology* 1996;53:345-51.
- 35) Monie IW, Nelson MM, Evans HM. Abnormalities of the urinary system of rat embryos resulting from maternal pteroylglutamic acid deficiency. *Anat Rec* 1954;120:119-36.
- 36) Monie IW, Nelson MM, Evans HM. Abnormalities of the urinary system of rat embryos resulting from transitory deficiency of pteroylglutamic acid during gestation. *Anat Rec* 1957;127:711-24.
- 37) Maizels M. *Normal development of the urinary tract*. Campbell's Urology, 5th ed. Philadelphia: Saunders, WB, 1986.
- 38) Li DK, Daling JR, Mueller BA, Hickok DE, Fantel AG, Weiss NS. Periconceptional multivitamin use in relation to the risk of congenital urinary tract anomalies. *Epidemiology* 1995;6:212-8.
- 39) Thersch JB. Therapeutic abortions with a folic acid antagonist, aminopteroylglutamic acid (4-amino PGA), administered by the oral route. *Am J Obstet Gynecol* 1952;63:298-304.
- 40) Yang Q, Khoury MJ, Olney RS, Mulinare J. Does periconceptional multivitamin use reduce the risk for limb deficiency in offspring? *Epidemiology* 1997;8:157-61.
- 41) Daly LE, Kirke PN, Molloy A, Weir DG, Scott JM. Folate levels and neural tube defects. Implication for prevention. *JAMA* 1995;274:1688-702.
- 42) International Clearinghouse for birth defects monitoring systems Annual Report 2001 with data for 1999.

MALASSORBIMENTO DI MICRONUTRIENTI E MALATTIA CELIACA IN GRAVIDANZA

Anna Velia Stazi

Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La malattia celiaca

La malattia celiaca (MC), o intolleranza al glutine, è una condizione cronica che interessa principalmente l'intestino i cui sintomi principali, nella rara forma classica o conclamata (sprue celiaca) che compare nella prima infanzia, includono malassorbimento, diarrea, perdita di peso, anemia, ipocalcemia e carenze vitaminiche specialmente acido folico (AF) e vitamina B12. Tuttavia le forme più frequenti di MC sono ad andamento cronico senza gli evidenti sintomi intestinali. Inoltre in tali forme, la MC si può trovare in associazione con altre patologie quali epatiti croniche attive, malattie endocrine (ad esempio, diabete mellito insulino-dipendente, tiroiditi, morbo di Addison), malattie autoimmuni (ad esempio, cirrosi biliare primitiva) e tumori maligni (ad esempio, linfoma intestinale non-Hodgkin). Generalmente le forme di MC senza sintomi intestinali sono le subcliniche, spesso con carenza di ferro o di calcio, o le silenti, diagnosticate mediante l'uso di metodi di screening (1).

La multifattorialità patogenetica è dovuta a due fattori, uno esogeno (il glutine) e l'altro endogeno (il controllo genetico). Il glutine è tossico solo per gli individui geneticamente predisposti ed è una proteina presente in molti cereali: frumento (gliadina), orzo (ordeina) segale (secalina); per contro il mais e l'avena, essendo esenti da glutine, possono venire usati nella dieta del paziente celiaco. Il controllo genetico implica l'ereditabilità della MC; infatti circa il 10% dei parenti di pazienti con MC hanno tale patologia, anche se con segni clinici diversi, inoltre se un gemello omozigote ha la MC, l'altro gemello è affetto nel 75% dei casi (1).

Il controllo genetico implica la presenza di un complesso genetico specifico HLA (Human Leukocyte Antigen); le regioni maggiormente interessate dell'HLA sono la DQ8 e con un ruolo di maggiore evidenza la DQ2; tali regioni controllano la risposta immunitaria al glutine mediante le cellule T. Gli stessi alleli sono osservati circa nel 30% dei famigliari che non mostrano alcun segno di intolleranza al glutine e la presenza degli alleli HLA è un indicatore di predisposizione alla MC ed è essenziale nella patogenesi dell'intolleranza (2). Esistono tuttavia, altri fattori genetici predisponenti non correlati a tale complesso, anche se i loro singoli contributi sono modesti e importanti per la modulazione del fenotipo (1, 3, 4). Inoltre, la complessità genetica ed eziologica della MC è resa evidente anche dal fatto che non esiste ancora un modello animale per il suo studio.

Per quello che riguarda la diagnosi si ricorre ai classici sintomi intestinali (solo forma conclamata), alla biopsia per valutare il danno intestinale in quanto la risposta immunitaria provoca riduzione dei villi fino alla atrofia e alle indagini sierologiche. Quest'ultima indagine si basa sulla ricerca di due differenti tipi di anticorpi:

- anti-gliadina (AGA), presenti nel 90% dei celiaci, immunoglobuline prodotte dalla mucosa intestinale e dai linfonodi mesenterici che in presenza del glutine si ha una reazione diretta contro la mucosa intestinale;

- anti-endomisio (EMA), presenti nella quasi totalità delle persone con la MC, immunoglobuline che in presenza del glutine sono dirette contro una proteina connettivale non collagenosa della lamina propria della mucosa intestinale (e di altri tessuti).

Pertanto la MC può essere considerata una condizione autoimmune anche se è richiesto il glutine come fattore esogeno per il suo innesco; infatti un recente metodo diagnostico si basa sulla ricerca degli anticorpi contro le transglutaminasi (tTG), enzimi tissutali più sensibili agli effetti autoimmuni della MC (5).

Il problema della MC sta diventando sempre più importante, visto il crescente numero di casi evidenziati di questa patologia a causa di una diagnosi più sensibile, grazie alla presenza di metodologie più sofisticate e alla maggiore consapevolezza delle forme subcliniche e silenti. Tali forme sono quelle più pericolose perché generalmente vengono diagnosticate in ritardo e quindi possono insorgere quando si sono innescate le altre patologie associate, avvalorando l'ipotesi, per alcune di loro, di un meccanismo patogenetico comune (6).

In Italia la crescente prevalenza delle forme silenti/subcliniche, è maggiore negli adulti che nei bambini. Perciò, il problema di sanità pubblica non è solo rappresentato dalla minoranza di casi conclamati, ma dalle decine di migliaia di persone che presentano patologie croniche legate alla MC, ma senza evidenti segni di enteropatia. La prevalenza nella popolazione italiana, considerando le persone affette dalla MC nelle sue varie forme, risulta essere secondo le stime più prudenti 1:200, perciò non può essere considerata una malattia rara (7-9).

Il trattamento di tale malattia è una dieta priva di glutine (DPG) che deve essere mantenuta per tutta la vita; anche per le altre patologie (inclusi gli effetti sulla riproduzione) associate a tale malattia la eventuale possibilità di prevenzione e di trattamento risulta essere la DPG; tuttavia tale trattamento non riguarda le patologie autoimmuni associate alla MC, in quanto la sola DPG non può risolverle perché ormai innescate (10).

Malattia celiaca e riproduzione

La MC è un fattore di rischio riproduttivo di notevole importanza con i suoi correlati problemi di malassorbimento ed è più prevalente nelle donne che negli uomini (1, 7, 10). Da qui l'importanza di diagnosticare precocemente la MC nella donna in età fertile per tutelare questa fascia di popolazione più sensibile ai rischi riproduttivi (11); questo vuol dire tutelare anche il concepito.

I dati epidemiologici e clinici esistenti mostrano che gli effetti della MC sulla donna in età fertile possono interessare direttamente la sfera riproduttiva o ripercuotersi sul concepito. Esistono alcuni punti interessanti da sottolineare riguardo la MC in gravidanza: non c'è correlazione tra la gravità dei segni della malattia e le alterazioni riproduttive (12); inoltre, la MC conclamata può apparire o riattivarsi durante la gravidanza o il puerperio (13, 14).

Tra le alterazioni riproduttive ritroviamo:

- comparsa della prima mestruazione: l'età media è significativamente ritardata nelle donne celiache (circa 13-14 anni) rispetto ai controlli (circa 12 anni) (11, 12);
- menopausa: l'età media nelle donne celiache è più precoce (circa 47-48 anni) rispetto ai controlli (circa 50 anni); quindi la fase fertile è ridotta nel complesso di 3-5 anni (12);
- infertilità: mostrata da donne con inspiegata infertilità ma con forme subcliniche di MC in cui vi è come unico segno l'anemia da mancanza di ferro (15, 16);
- amenorrea: aumento dell'incidenza con rischio relativo di circa 4 rispetto ai controlli (11);

- durata dell'allattamento: nelle madri non trattate, la durata è ridotta di circa 2,5 volte rispetto alle madri sottoposte alla DPG. Ritorna ai valori normali dopo il trattamento con la DPG (12).

Tra gli effetti sul concepito riscontriamo:

- aborto spontaneo: notevole aumento dell'incidenza con rischio relativo di circa 7-9 rispetto ai controlli (17-19);
- bambini sotto peso alla nascita: non c'è sostanziale differenza nell'incidenza prima (16%) e dopo (18%) la DPG. Apparentemente, la DPG non diminuisce il rischio del basso peso alla nascita che rimane alto (20);
- sui miglioramenti apportati dalla DPG, i dati non sono completamente concordi; tali differenze possono essere correlate a differenze socio-economiche, culturali e ambientali delle popolazioni studiate (17, 18);
- rischio di malformazioni congenite (20).

Malattia celiaca e malformazioni

Non esistono dati epidemiologici adeguati circa l'aumento dell'incidenza delle malformazioni congenite nelle donne con MC, ma solo alcuni rapporti di casi clinici isolati. Gli scarsi dati epidemiologici non evidenziano sinora un'associazione; ad esempio, Haslam *et al.* (21) non hanno evidenziato associazioni significative tra MC e difetti del tubo neurale (DTN) o carenze di folati. Tuttavia, non è stata ancora data una sufficiente attenzione a importanti fattori esogeni (dieta, ambiente) che possono interagire, anche in senso protettivo, nell'insorgenza di difetti congeniti.

Tuttavia la MC è un fattore di rischio plausibile per le malformazioni congenite giacché induce uno stato di malnutrizione generale o specifiche carenze di nutrienti come minerali (ferro, zinco) e vitamine (AF, B12, K, B6) (20). I dati relativi a carenze di singoli nutrienti indicano che hanno un ruolo riconosciuto per lo sviluppo prenatale; tali carenze sono un effetto diretto della MC.

Le problematiche legate alle carenze di AF e di altri micronutrienti, in particolare zinco e vitamina B12, devono essere considerate nel quadro di malassorbimento subclinico complessivo.

Ferro

La carenza con conseguente anemia è prevalente nei pazienti con MC e può essere il solo segno nei casi subclinici (7, 10, 15); inoltre è stata osservata una associazione tra aborti spontanei e carenza di ferro in donne con MC non trattata (22).

Vitamina K

Anche carenze di vitamina K, da parte della madre, possono danneggiare il concepito. Infatti, il malassorbimento cronico durante l'organogenesi, compreso quello causato dalla MC, può provocare condrodiplosia puntata con ipoplasia nasale e malformazioni della spina dorsale, simili a quelle causate dall'anticoagulante warfarin (23). Perciò la MC, non adeguatamente trattata, può essere considerata una ulteriore causa di tale malformazione.

Vitamina B6

È stato dimostrato che vi è un minore assorbimento di vitamina B6 nelle donne con MC; di per sé i livelli plasmatici sono più bassi durante la gravidanza, perciò nelle donne con MC il problema della carenza è maggiore (24). La vitamina B6 è un importante fattore antiteratogeno secondo dati sperimentali (25). Pertanto, la carenza di vitamina B6 nei pazienti con MC potrebbe aumentare la suscettibilità agli agenti embriotossici.

Zinco

L'assorbimento dello zinco, come per gli altri elementi in traccia, è un processo attivo che avviene nell'intestino tenue, quando questo tratto digestivo viene danneggiato come nella MC, si ha una riduzione dell'assorbimento. La sua carenza è quasi sempre accompagnata dalla carenza di AF. Bassi livelli sierici osservati in madri con: aborto precoce, parto prematuro, ritardato e distocico e ritardo di crescita intrauterina (26). La carenza di zinco è un fattore di rischio teratogeno; bassi livelli sierici materni sono associati con aumentato rischio dei DTN (26).

Vitamina B12

Il malassorbimento di vitamina B12 è una condizione comune nella MC non trattata e le sue concentrazioni dovrebbero essere misurate routinariamente prima della somministrazione di fattori che favoriscono la eritropoiesi (27). Anche se spesso associate tra loro, le carenze di AF e di vitamina B12 possono essere fattori di rischio indipendenti per i DTN; bassi livelli di vitamina B12 sono stati riscontrati nel liquido amniotico di donne con feti che presentavano DTN (28). La carenza di vitamina B12 è legata al problema della anemia megaloblastica, che può portare a un progressivo danno neurologico: questo rischio va particolarmente considerato in gravidanza. L'anemia può essere prevenuta dalla supplementazione di AF; questo però può mascherare l'insorgenza di eventuali sintomi neurologici legati alla carenza di vitamina B12. Tale problema va considerato soprattutto per alcuni gruppi a rischio come gli anziani, i vegetariani e le donne con MC che assumono AF nel periodo periconcezionale (29, 30).

Acido folico

I bassi livelli sierici di AF sono stati messi in relazione all'aumento del rischio di aborti spontanei nelle donne con MC, ipotizzando che il concepimento sia avvenuto nel periodo di maggiore carenza (19). Le sue carenze, in particolari fasi organogenetiche, hanno un ruolo nella patogenesi di diverse malformazioni come: DTN, schisi orolabiale, difetti cardiaci, anomalie del tratto urinario, difetti della riduzione degli arti, stenosi ipertrofica congenita del piloro. Questo rende evidente la necessità di avere migliori dati epidemiologici in gruppi a rischio, come le donne con MC. Oltre che con le malformazioni, l'inadeguata assunzione è associata con un aumentato rischio di ritardo di crescita intrauterina, distacco e infarto della placenta, parti pretermine (29).

In pazienti con MC e in DPG, nel periodo periconcezionale, supplementazioni dietetiche dovrebbero essere considerate perché anche modeste carenze di AF possono essere dannose per il concepito. Per monitorare un eventuale stato di carenza, la concentrazione di AF negli eritrociti è un migliore indicatore del rischio di malformazioni congenite rispetto ai livelli sierici (31). A tale riguardo, può essere interessante considerare che i livelli sierici di vitamine ed

elementi in traccia possono non essere il miglior indicatore per predire il rischio teratogeno come ad esempio, lo zinco, la sua concentrazione nei leucociti, capelli e unghie risulta essere più affidabile (31).

Conclusioni

La MC rappresenta un evidente fattore di rischio per la gravidanza, aumentando l'incidenza di aborto spontaneo e basso peso alla nascita. Non vi sono dati epidemiologici adeguati circa la possibile associazione tra la MC e l'aumento del rischio di malformazioni congenite in generale o di uno specifico difetto, ma può essere un rischio plausibile. La MC può indurre carenze di vitamine specifiche e oligoelementi che sono associate con un aumento del rischio teratogeno sia nell'uomo che negli animali da laboratorio:

- 1) DTN: carenze di AF, vitamina B12 e/o zinco (26, 28, 29);
- 2) schisi orofacciali: carenze di AF (29);
- 3) malformazioni scheletriche: carenze di vitamina K (23);
- 4) il concepito di madri con MC può essere più sensibile agli agenti teratogeni poiché ha una scarsa assunzione di fattori protettivi come la vitamina B6 (25).

Pertanto, questi dati suggeriscono la necessità di ulteriori studi epidemiologici sugli esiti della gravidanza nelle donne con MC, come suggeriscono i dati preliminari di Hozyasz (32). Tali studi dovranno considerare anche le interazioni con altri fattori di rischio nutrizionali e ambientali. Inoltre va ricordato che le forme subcliniche di MC sono associate con un aumentato rischio di disendocrinopatie, tra cui ipotiroidismo e diabete mellito insulino-dipendente; queste malattie sono di per sé in relazione con un aumentato rischio teratogeno. È stato ipotizzato che le alterazioni ormonali siano un effetto diretto della MC piuttosto che una conseguenza secondaria del malassorbimento (10). Da qui si evidenziano le complesse interazioni tra i fattori ambientali e le condizioni autoimmuni ed endocrine che coinvolgono tali patologie; questo dovrebbe stimolare lo studio di modelli animali, tuttora non disponibili, per chiarire tali interazioni (10).

Le malformazioni congenite sono degli eventi rari e per effettuare adeguati studi epidemiologici occorrono campioni di dimensioni rilevanti per determinare un aumento del rischio; le donne con MC hanno già una bassa fertilità, che potrebbe in parte ridurre l'osservazione di un aumento delle malformazioni congenite della prole.

La MC dovrebbe essere sospettata in tutti quei casi "sine materia" di disturbi della riproduzione femminile o di esiti sfavorevoli della gravidanza. La conoscenza della complessità della MC comprese le forme silenti/subcliniche e l'associazione con altre patologie, la diagnosi precoce e il conseguente inizio della DPG sono i soli rilevanti approcci per prevenire seri danni alla salute riproduttiva delle donne con MC.

Tuttavia, seguire la DPG non offre, di per sé, una completa protezione. Infatti, non possono venire trascurati i possibili effetti cronici dell'assunzione involontaria e continua di piccole dosi di glutine che possono contaminare gli amidi usati negli alimenti (ad esempio, additivi) e farmaci (ad esempio, eccipienti). Va sottolineato che sull'effettivo rischio di queste esposizioni non esistono, al momento, studi adeguati, per cui occorre adottare un atteggiamento cautelativo (33). Una soluzione del problema potrebbe essere l'inserimento in etichetta della dicitura "prodotto idoneo all'uso per il paziente celiaco", oppure "prodotto esente da glutine", riguardante non solo gli ingredienti principali ma anche gli additivi e/o eccipienti in essi contenuti.

In ogni caso le donne con MC sono un sottogruppo a rischio la cui vita riproduttiva e gravidanza dovranno essere assistite e monitorate clinicamente e nutrizionalmente.

Bibliografia

- 1) Troncone R, Greco L, Auricchio S. Gluten-sensitive enteropathy. *Pediatr Clin North Am* 1996;43:355-73.
- 2) Brandtzaeg P, Halstensen TS, Huitfeldt HS, Krajci P, Kvale D, Scott H, *et al.* Epithelial expression of HLA, secretory component (poly-Ig receptor) and adhesion molecules in the human alimentary tract. *Ann NY Acad Sci* 1992;664:157-79.
- 3) Sollid LM. Genetics of the immune response to gluten in coeliac disease. *Dig Dis* 1998;16:345-7.
- 4) Rotter JL, Landaw EM. Measuring the genetic contribution of a single locus to a multilocus disease. *Clin Genet* 1984;26:529-42.
- 5) Gentile V, Violante V, D'Amico B, Illiano M, Luongo A. Tissue transglutaminase and coeliac disease pathogenesis: potential molecular mechanisms for other human diseases. *Neurochem Int* 2002;40:79-83.
- 6) Kero J, Gissler M, Hemminki E, Isolauri E. Could TH1 and TH2 diseases coexist? Evaluation of asthma incidence in children with coeliac disease, type 1 diabetes, or rheumatoid arthritis: a register study. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:781-3.
- 7) Bottaro G, Cataldo F, Rotolo N, Spina M, Corazza GR. The clinical pattern of subclinical/silent celiac disease. An analysis on 1026 consecutive cases. *Am J Gastroenterol* 1999;94:691-6.
- 8) Kolho KL, Titinen A, Tuppalä M, Unkila-Kallio L, Saavilahiti E. Screening for coeliac disease in women with a history of recurrent miscarriage or infertility. *Br J Obstet Gynecol* 1999;106:171-3.
- 9) Riestra S, Fernandez E, Rodrigo L, Garcia S, Ocio G. Prevalence of coeliac disease in the general population of northern Spain. Strategies of serologic screening. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:398-402.
- 10) Stazi AV, Mantovani A. La malattia celiaca: fattore di rischio per la donna in età fertile. *Minerva Ginecologica* 2000;52:189-96.
- 11) Sher KS, Jayanthi V, Probert CSJ, Stewart CR, Mayberry JF. Infertility, obstetric and gynaecological problems in coeliac sprue. *Dig. Dis* 1994;12:186-90.
- 12) Ciacci C, Cirillo M, Auriemma G, Di Dato G, Sabbatini F, Mazzacca G. Celiac disease and pregnancy outcome. *Am J Gastroenterol* 1996;91:718-22.
- 13) Malnick SD, Atali M, Lurie Y, Fraser G, Geltner D. Celiac sprue presenting during the puerperium: a report of three cases and a review of the literature. *J Clin Gastroenterol* 1998;26:164-6.
- 14) Erdozain JC, Martin de Argila C, Cerezo E, Lizasoain J, Presa M. Adult celiac disease: reactivation during pregnancy and puerperium. *Am J Gastroenterol* 1993;88:1139-40.
- 15) Collin P, Vilska S, Heinonen PK, Hallstrom O, Pikkarinen P. Infertility and coeliac disease. *Gut* 1996;39:382-4.
- 16) Molteni N, Bardella MT, Bianchi PA. Obstetric and gynecological problems in women with untreated celiac sprue. *J Clin Gastroenterol* 1990;12:37-9.
- 17) Sher KS, Mayberry JF. Female Fertility, obstetric and gynecological history in coeliac disease. *Digestion* 1994;55:243-6.
- 18) Smecuol E, Maurino E, Vazquez H, Pedreira S, Niveloni S, Mazure R, *et al.* Gynecological and obstetric disorders in coeliac disease: frequent clinical onset during Pregnancy or the puerperium. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:63-9.
- 19) Ogborn ADR. Pregnancy in patients with coeliac disease. *Brit J Obstet Gynecol* 1975;82:293-6.
- 20) Stazi AV, Mantovani A. Carenze di nutrienti specifici nella malattia celiaca: possibili fattori di rischio per il concepito. *Bambini e Nutrizione* 2000;7:15-9.

- 21) Haslam N, Lock RJ, Unsworth DJ. Coeliac disease, anaemia and pregnancy. *Clin Lab* 2001;47(9-10):467-9.
- 22) De Sandre G, Caramaschi P. Untreated celiac disease with bad outcome of three pregnancies followed by a fourth normal pregnancy after two years of gluten-free diet. *Am J Gastroenterol* 1996;91:2653.
- 23) Menger H, Lin AE, Toriello HV, Bernert G, Spranger JW. Vitamin K deficiency embryopathy: a phenocopy of the warfarin embryopathy due to a disorder of embryonic vitamin K metabolism. *Am J Med Genet* 1997;72:129-34.
- 24) Reinken L, Ziegler H, Berger H. Vitamin B6 nutriture of children with acute celiac disease, celiac disease in remission, and of children with normal duodenal mucosa. *Am J Clin Nutr* 1976;29:750-3.
- 25) Jacobsson C, Granstrom G. Effects of vitamin B6 on beta-aminopropionitrile induced palatal cleft formation in the rat. *Cleft Palate Craniofac J* 1997;34:95-100.
- 26) Jameson S. Zinc status in pregnancy; the effect of zinc therapy on perinatal mortality, prematurity and placental ablation. *Ann NY Acad Sci* 1993;678:178-92.
- 27) Daheme A, Ghosh S. Vitamin B12 deficiency in untreated celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:745-50.
- 28) Steen MT, Boddie AM, Fisher AJ, Macmahon W, Saxe D, Sullivan KM, *et al*. Neural tube defects are associated with low concentration of cobalamine (vitamin B12) in amniotic fluid. *Prenat Diagn* 1998;18:545-55.
- 29) Hall J, Solehdin F. Folic acid for the prevention of congenital anomalies. *Eur J Pediatr* 1998;157:445-50.
- 30) Rothenberg SP. Increasing the dietary intake of folate: pros and cons. *Semin Hematol* 1999;36:65-74.
- 31) Stoll C, Dott B, Alembik Y, Koehl C. Maternal trace elements, vitamin B12, acid folic and fetal malformations. *Repr Toxicol* 1999;13:53-7.
- 32) Hozyasz KK. Coeliac disease and birth defects in offspring. *Gut* 2001;49:738.
- 33) Abdulkarim AS, Murray JA. Celiac disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2002;5:27-38.

XENOBIOTICI E FOLATI

Alberto Mantovani

Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Un adeguato apporto di acido folico (AF) è certamente un importante fattore di prevenzione, sia per specifiche malformazioni quali, in primo luogo, i difetti del tubo neurale (DTN), che più in generale per il rischio di esiti avversi in gravidanza (1). Risulta evidente il problema di che cosa voglia dire “adeguato”. Infatti, i livelli di assunzione sufficienti per la popolazione generale possono non essere protettivi per soggetti con difetti metabolici che coinvolgono il trasporto o il metabolismo dei folati, oppure con problemi di malassorbimento. Oltre alle condizioni di ordine genetico-metabolico, occorre dare un’adeguata attenzione a quei fattori esogeni che possono interferire, in maniera più o meno marcata, con l’assorbimento e/o il metabolismo dei folati, rendendo i soggetti esposti maggiormente vulnerabili. Tali fattori comprendono in primo luogo numerosi tipi di farmaci, anche di largo uso; inoltre sostanze presenti nell’ambiente di vita e di lavoro e contaminanti ambientali.

Questa breve rassegna intende riassumere i dati più importanti sulle interazioni fra xenobiotici e folati come fattori di rischio per lo sviluppo prenatale; intende, inoltre, fornire indicazioni sui possibili fattori di suscettibilità associati a meccanismi di azione specifici e sui settori ove sono necessari approfondimenti.

Interazioni fra xenobiotici e folati in tossicologia prenatale

Antiblastici: metotrexato e aminopterin

Gli antiblastici metotrexato e aminopterin sono riconosciuti teratogeni umani, il cui utilizzo in gravidanza è assolutamente controindicato. I due composti sono antimetaboliti dell’AF, in particolare sono inibitori della diidrofolato-reduttasi. Nei bambini esposti in utero durante l’organogenesi, i due composti hanno indotto a una sindrome dismorfica complessa caratterizzata da labioschisi (LS), ipoplasia ossa delle craniche, facies dismorfica, difetti degli arti, e ritardo di crescita intrauterina (2). Secondo dati sperimentali sul topo, questi composti non inducono tanto effetti teratogeni quanto incrementano prevalentemente il rischio di embriofetaleità (3), anche nella fase pre-impianto (4). È di notevole interesse il fatto che, in seguito alla specifica inibizione della diidrofolato-reduttasi, sia nei roditori di laboratorio che nell’essere umano non si sia osservato alcun incremento di DTN.

Va infine ricordato che l’effetto teratogeno umano è stato osservato in seguito all’uso farmacologico. Tuttavia, non si può escludere un rischio riproduttivo anche in seguito a esposizione occupazionale. Un maggiore incremento di abortività spontanea è stato infatti osservato nelle infermiere che utilizzano antiblastici, tra cui anche il metotrexato (5); è ovviamente difficile discriminare gli effetti dei singoli composti, tuttavia questi dati inducono a

dare una maggiore attenzione verso gli effetti riproduttivi delle esposizioni lavorative a farmaci che interagiscono con i folati.

Antiepilettici

Gli antiepilettici in genere (compresi barbiturici) sono associati sia con una riduzione dei livelli sierici di folati (6) che con un incremento del rischio di determinate malformazioni, quali palatoschisi (PS), difetti cardiovascolari e urinari (7). Non è tuttavia chiaro l'effettivo rilievo dell'interazione con i folati nell'aumentato rischio teratogeno in cui giocano probabilmente diversi e complessi fattori, tra cui anche la malattia epilettica di per sé (2).

Una particolare attenzione va data a due composti: carbamazepina e acido valproico. Si tratta di due farmaci antiepilettici che aumentano il rischio di DTN: nelle gravidanze esposte durante la fase suscettibile dell'organogenesi (sino alla chiusura del neuroporo caudale, intorno al 28° giorno di gravidanza), il rischio è pari a 1-1,5% (2). Per la carbamazepina il meccanismo di azione non è stato ancora chiarito; vengono ipotizzati diversi siti di interazione con il metabolismo dei folati, e in particolare una inibizione a monte della metiletetraidrofolato-reduttasi (8).

Molto maggiori sono le informazioni sugli effetti e i meccanismi dell'acido valproico, uno dei teratogeni umani maggiormente indagati: si tratta infatti di un antiepilettico di notevole efficacia, per cui vi è un notevole interesse verso la ricerca di congeneri con valore terapeutico paragonabile ma non teratogeni. L'acido valproico incrementa soprattutto il rischio di spina bifida lombosacrale; inoltre nei bambini affetti si possono osservare altre malformazioni, soprattutto cardiovascolari.

È indubbio che gli effetti teratogeni della sostanza abbiano una base farmacogenetica, tuttora da chiarire, per cui il rischio riguarda essenzialmente una porzione suscettibile di soggetti esposti; inoltre diversi studi sperimentali indicano che l'interazione con il metabolismo dei folati ha un ruolo importante nella patogenesi. Il trattamento con acido valproico altera il metabolismo dei folati nei roditori, con un incremento del tetraidrofolato, e un'inibizione della sua coniugazione con gruppi formilici (9). Risultati controversi hanno dato le indagini sulla prevenzione dei DTN nei roditori mediante la supplementazione con AF e altre vitamine con un ruolo associato quali B6 e B12 (10, 11). Per contro, un incremento significativo di tali malformazioni è stato indotto mediante il trattamento congiunto con acido valproico e inibitori della diidrofolato reduttasi (metotrexato o trimetoprim) rispetto al trattamento con solo acido valproico (3, 12). Va notato, inoltre, che ambedue gli inibitori non alterano la cinetica dell'acido valproico né inducono DTN nei roditori. Secondo l'ipotesi più attendibile sul meccanismo di azione teratogeno dell'acido valproico (13, 14), la sostanza interagisce con il ciclo della metionina, riducendo la sintesi dell'aminoacido e i livelli di glutazione, e aumentando contemporaneamente i livelli di omocisteina, e la ipometilazione del DNA embrionale. In particolare, l'omocisteina inibisce lo sviluppo dell'epitelio neurale, interagendo con recettori di membrana. Tali effetti indotti dall'acido valproico sono di breve durata, ma sufficienti a indurre DTN se l'esposizione avviene durante il periodo critico.

Altri farmaci che riducono i livelli di folati

Diversi altri farmaci interagiscono con il metabolismo dei folati attraverso svariati meccanismi (15, 16); tuttavia la correlazione di tali effetti con un'azione teratogena nell'uomo non è provata.

Diversi antinfiammatori non steroidei (ad esempio, sulfasalazina, indometacina, ibuprofen) sono inibitori competitivi di enzimi coinvolti nel metabolismo dei folati, tra cui la diidrofolato-reduttasi; per altri antinfiammatori (ad esempio, acetaminofen, aspirina) tale attività, pur presente, è debole (17); viene suggerita anche un'alterazione del trasporto dei folati per un meccanismo di competizione con i siti di legame sulle proteine sieriche (18). Questi farmaci non sono teratogeni nell'uomo; esiste un rischio di effetti avversi sull'ultima fase fetale e sul parto che va valutato attentamente, ma non appare in alcun modo associabile a un'interazione con i folati (19).

Alcune sostanze, come l'antibatterico trimetoprim riducono i livelli di folati, ma non sono stati associati ad alcun significativo effetto teratogeno, e in particolare con DTN, negli studi sperimentali (12); questo dato merita attenzione, considerando in particolare il trimetoprim che è uno specifico inibitore della diidrofolato reduttasi batterica. Per contro, dati recenti, per quanto limitati e bisognosi di conferme, indicano un incremento dei DTN nelle gravidanze esposte al trimetoprim (20); potrebbe pertanto non essere escluso un aumento di rischio in donne specificamente suscettibili a causa di un ridotto assorbimento e/o utilizzo dei folati.

I possibili effetti sul concepito dei contraccettivi orali sono stati indagati sia per le gravidanze che comunque si verificano, sia per il potenziale rischio associato a effetti persistenti sull'equilibrio endocrino; non è stato sinora identificato un rischio teratogeno nell'essere umano. Tuttavia, alcuni studi clinici hanno indicato un abbassamento modesto ma significativo dei livelli sierici ed eritrocitari di folati, e anche di vitamina B12 e B6, in seguito ad assunzione di contraccettivi orali (21); alcune indicazioni associano tale effetto ai componenti estrogeni di questi prodotti (22). Tali dati suggeriscono un effetto complessivo su differenti vitamine importanti per lo sviluppo intrauterino; pertanto, potrebbero essere utili ulteriori studi che indaghino le interazioni fra fattori che modulano l'equilibrio endocrino e i folati.

Sostanze presenti nell'ambiente di vita e di lavoro

Tra i fattori ambientali, per cui esistono evidenze di un abbassamento dei livelli di folati, un posto importante spetta sicuramente al fumo di tabacco; i possibili meccanismi riguardano un incremento dello stress ossidativo e/o un'inattivazione della vitamina (23). Numerosi studi hanno identificato il fumo come un fattore di rischio per LS e PS; questo effetto è verosimilmente associato a complesse interazioni con fattori di suscettibilità genetici, compresi anche polimorfismi di geni coinvolti nel metabolismo dei folati (24).

Il prolungato consumo di alte dosi di alcool etilico è associato a bassi livelli sierici e tissutali di folati; una lieve riduzione si osserva anche a dosi moderate. I possibili meccanismi riguardano uno stato di malassorbimento (in particolare di tiamina, folati e vitamina B6) e/o effetti tossici dell'etanolo quali l'incremento del danno cellulare e la inibizione della metionina sintetasi (23). L'abuso di alcool è un riconosciuto fattore teratogeno; uno studio recente sul topo ha investigato l'eventuale ruolo protettivo della supplementazione con l'aminoacido metionina, il cui metabolismo è strettamente associato ai folati e alla vitamina B12, nei confronti degli effetti teratogeni dell'etanolo. I risultati hanno mostrato che l'azione protettiva è specifica per alcuni tipi di difetti (PS, difetti di riduzione degli arti) mentre è debole nei confronti dei DTN e completamente assente nei confronti di altri effetti quali malformazioni dello scheletro assiale ed embrioletalità (25). Altri studi sperimentali nel topo hanno riguardato il metanolo, composto di notevole tossicità, presente in tracce variabili negli alcolici e metabolizzato mediante un processo folato-dipendente. La dieta carente di folati in gravidanza aumentava la tossicità prenatale del metanolo (PS, DTN, ritardo di crescita intrauterina) mentre non aveva effetti sulla genotossicità transplacentare, misurata dalla presenza di micronuclei negli eritrociti fetali (26,

27). Questi studi sembrano indicare che le interazioni con fasi diverse dei complessi processi in cui sono coinvolti i folati producono effetti tossici piuttosto specifici.

Sorprendentemente, vi sono scarsi dati sulle interazioni fra contaminanti ambientali e folati. Gli unici dati disponibili riguardano composti metallici. Bound *et al.* (28) hanno riscontrato un'associazione fra un aumentato rischio di anencefalia ed elevate concentrazioni (> 10 mg/l) di piombo nell'acqua potabile. Accanto a concause legate al basso status socio-economico delle aree considerate, gli autori hanno suggerito che il rischio teratogeno osservato fosse associato a un effetto antagonista del piombo sull'assorbimento intestinale dello zinco, causando a sua volta un ridotto assorbimento e utilizzo dell'AF.

L'arsenico induce embriolealtà e DTN nel topo. Il trattamento con folato o con AF non ha alcuna azione protettiva sugli effetti teratogeni dell'arsenico, sia in due ceppi di topi inbred (LM/Bc e SWV) senza elevato rischio di malformazioni spontanee, sia nelle femmine eterozigoti del ceppo mutante murino Splotch che invece ha un'elevata incidenza spontanea di DTN (29). Il ceppo Splotch presenta un difetto metabolico che porta a un carente apporto di folati nel ciclo della pirimidina: la supplementazione di AF nella dieta riduce parzialmente l'incidenza di DTN in tale ceppo (30). Per contro l'esposizione ad arsenico ha pressoché raddoppiato (40% vs 24%) l'incidenza di anencefalia in un ceppo topi knock-out per una proteina di trasporto (folate binding protein 2, Folbp2); l'incidenza è stata ulteriormente aumentata (64%) nei topi alimentati con una dieta carente di folati, inoltre l'effetto non è stato indotto da un alterato metabolismo dell'arsenico (31). Questi studi indicano come specifiche alterazioni del metabolismo dei folati possano influenzare in modo molto differenziato la suscettibilità a determinati fattori di rischio ambientali.

Conclusioni

I dati disponibili sulle interazioni fra xenobiotici e folati in tossicologia prenatale mostrano, in primo luogo, che occorrono ulteriori studi mirati non solo agli effetti di farmaci, ma soprattutto ai contaminanti dell'ambiente e degli alimenti. Ad esempio, gli studi su piombo e arsenico (28, 30, 31) indicano la necessità di una maggiore attenzione al ruolo di inquinanti ubiquitari come i composti metallici. Inoltre, le informazioni sugli effetti dei contraccettivi orali (21, 22) potrebbero suggerire l'opportunità di studi, sinora del tutto mancanti, su eventuali interazioni fra folati e sostanze ambientali con effetti estrogenici o, in generale, endocrini.

Il complesso metabolismo dei folati può presentare diversi siti vulnerabili ad agenti esogeni con differenti meccanismi di azione. Esempi ne sono, dal punto di vista clinico le differenti sindromi dismorfiche indotte da metotrexato e acido valproico (2); dal punto di vista sperimentale gli effetti specifici indotti dall'interazione fra deficit di folati e teratogeni quali etanolo, metanolo e arsenico (25-27, 30, 31). Questi dati inducono due ordini di considerazioni.

- le interazioni fra xenobiotici e fasi del metabolismo dei folati potrebbero avere un ruolo nella patogenesi di esiti sfavorevoli della gravidanza non limitato ad alcune specifiche malformazioni, quali i DTN;
- l'abbassamento dei livelli di folati (a livello di organismo e/o di tessuto bersaglio) potrebbe aumentare la vulnerabilità ad agenti esogeni del concepito. Pertanto quelle condizioni (alimentari, metaboliche, genetiche) che riducono l'assorbimento o l'utilizzo dei folati potrebbero meritare attenzione quali fattori di suscettibilità nello studio di popolazioni esposte a farmaci o xenobiotici ambientali. Un esempio sono le diffuse forme subcliniche di malattia celiaca, caratterizzate da un malassorbimento cronico di nutrienti essenziali tra cui i folati e le vitamine B12 e B6 pur in assenza di sintomi intestinali conclamati (32).

Oltre che come base e stimolo per la ricerca, i dati disponibili sulle interazioni fra xenobiotici e folati potrebbero già dare utili indicazioni anche per l'azione socio-sanitaria.

L'esposizione a fattori ambientali o l'utilizzo di determinati farmaci di uso comune (ad esempio, antinfiammatori non steroidei) (17, 18) che interagiscono con i folati potrebbero essere usati congiuntamente ad altri elementi quali l'anamnesi clinica (32) e riproduttiva materna (33) nel costruire una griglia per identificare donne maggiormente a rischio, e quindi per mirare gli interventi di prevenzione e di comunicazione.

Bibliografia

- 1) Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. *Placenta* 1999;20:519-29.
- 2) Koren G (Ed.). *Maternal-fetal toxicology: a clinicians' guide*. New York: Marcel Dekker; 1994.
- 3) Elmazar MM, Nau H. Methotrexate increases valproic acid-induced developmental toxicity, in particular neural tube defects in mice. *Teratog Carcinog Mutagen* 1992;12:203-10.
- 4) O'Neill C. Endogenous folic acid is essential for normal development of preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1998;13:1312-6.
- 5) Ritchie MA, McAdams C, Fritz N. Exposure risk in the handling and administration of chemotherapy agents: a review and synthesis of the literature. 2000; 7: Document 4. The Online Journal of Knowledge Synthesis for Nursing. Disponibile all'indirizzo: <http://www.sti.iupui.edu/library/ojksn/toc.html>; ultima consultazione 7 ottobre 2002.
- 6) Hiilesmaa VK, Teramo K, Granstrom ML, Bardy AH. Serum folate concentrations during pregnancy in women with epilepsy: relation to antiepileptic drug concentrations, number of seizures, and fetal outcome. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;287:577-9.
- 7) Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 2000;343:1608-14.
- 8) Lucock MD, Wild J, Schorah CJ, Levene MI, Hartley R. The methylfolate axis in neural tube defects: in vitro characterisation and clinical investigation. *Biochem Med Metab Biol* 1994; 52:101-14.
- 9) Wegner C, Nau H. Alteration of embryonic folate metabolism by valproic acid during organogenesis: implications for mechanism of teratogenesis. *Neurology* 1992;42:17-24.
- 10) Elmazar MM, Thiel R, Nau H. Effect of supplementation with folic acid, vitamin B6, and vitamin B12 on valproic acid-induced teratogenesis in mice. *Fundam Appl Toxicol* 1992;18:389-94.
- 11) Hansen DK, Grafton TF, Dial SL, Gehring TA, Siitonen PH. Effect of supplemental folic acid on valproic acid-induced embryotoxicity and tissue zinc levels in vivo. *Teratology* 1995 ;52:277-85
- 12) Elmazar MM, Nau H. Trimethoprim potentiates valproic acid-induced neural tube defects (NTDs) in mice. *Reprod Toxicol* 1993;7:249-54.
- 13) Hishida R, Nau H. VPA-induced neural tube defects in mice. I. Altered metabolism of sulfur amino acids and glutathione. *Teratog Carcinog Mutagen* 1998;18:49-61.
- 14) Alonso-Aperte E, Ubeda N, Achon M, Perez-Miguelsanz J, Varela-Moreiras G. Impaired methionine synthesis and hypomethylation in rats exposed to valproate during gestation. *Neurology* 1999 Mar 10;52(4):750-6.
- 15) Lambie DG, Johnson RH. Drugs and folate metabolism. *Drugs* 1985;30:145-55.

- 16) Desouza C, Keebler M, McNamara DB, Fonseca V. Drugs affecting homocysteine metabolism: impact on cardiovascular risk. *Drugs* 2002;62:605-16.
- 17) Baggott JE, Morgan SL, Ha T, Vaughn WH, Hine RJ. Inhibition of folate-dependent enzymes by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem J* 1992;282:197-202.
- 18) Alonso-Aperte E, Varela-Moreiras G. Drugs-nutrient interactions: a potential problem during adolescence. *Eur J Clin Nutr* 2000;54 Suppl. 1:S69-74.
- 19) Janssen NM, Genta MS. The effects of immunosuppressive and anti-inflammatory medications on fertility, pregnancy, and lactation. *Arch Intern Med* 2000;160:610.
- 20) Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Neural tube defects in relation to use of folic acid antagonists during pregnancy. *Am J Epidemiol* 2001;153: 961-8.
- 21) Shojania AM. Oral contraceptives: effect of folate and vitamin B12 metabolism. *Can Med Assoc J* 1982;126:244-7.
- 22) Brattstrom L, Israelsson B, Olsson A, Andersson A, Hultberg B. Plasma homocysteine in women on oral oestrogen-containing contraceptives and in men with oestrogen-treated prostatic carcinoma. *Scand J Clin Lab Invest* 1992;52:283-7.
- 23) van den Berg H, van der Gaag M, Hendriks H. Influence of lifestyle on vitamin bioavailability. *Int J Vitam Nutr Res* 2002;72:53-9.
- 24) Bianchi F, Calzolari E, Ciulli L, Cordier S, Gualandi F, Pierini A, Mossey P. Ambiente e genetica nell'eziologia della labioschisi e palatoschisi con particolare riferimento al ruolo dell'acido folico. *Epidemiol Prev* 2000;24:21-7.
- 25) Padmanabhan R, Ibrahim A, Bener A. Effect of maternal methionine pre-treatment on alcohol-induced exencephaly and axial skeletal dysmorphogenesis in mouse fetuses. *Drug Alcohol Depend* 2002;65:263-81.
- 26) Sakanashi TM, Rogers JM, Fu SS, Connelly LE, Keen CL. Influence of maternal folate status on the developmental toxicity of methanol in the CD-1 mouse. *Teratology* 1996; 54(4):198-206.
- 27) Fu SS, Sakanashi TM, Rogers JM, Hong KH, Keen CL. Influence of dietary folic acid on the developmental toxicity of methanol and the frequency of chromosomal breakage in the CD-1 mouse. *Reprod Toxicol* 1996;10:455-63.
- 28) Bound JP, Harvey PW, Francis BJ, Awwad F, Gatrell AC. Involvement of deprivation and environmental lead in neural tube defects: a matched case-control study. *Arch Dis Child* 1997;76:107-12.
- 29) Gefrides LA, Bennett GD, Finnell RH. Effects of folate supplementation on the risk of spontaneous and induced neural tube defects in Splotch mice. *Teratology* 2002;65:63.
- 30) Fleming A, Copp AJ. Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects. *Science* 1998;280:2107-9.
- 31) Wlodarczyk B, Spiegelstein O, Gelineau-van Waes J, Vorce RL, Lu X, Le CX, Finnell RH. Arsenic-induced congenital malformations in genetically susceptible folate binding protein-2 knockout mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;177:238-46.
- 32) Stazi AV, Mantovani A. La malattia celiaca: fattore di rischio per la donna in età fertile. *Minerva Ginecol* 2000;52:189-96.
- 33) Bianca S, Bianca M, Bonaffini F, Ettore G. The role of maternal reproductive history in the aetiology of neural tube defects. *Med Hypotheses* 2002;58:113-4.

SCHISI OROFACCIALI E GENETICA DEI FOLATI

Michele Rubini

Sezione di Genetica Medica, Dipartimento di Medicina Sperimentale Diagnostica, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara

Introduzione

La labiopalatoschisi (LPS) e la palatoschisi (PS) costituiscono le più comuni malformazioni congenite craniofacciali umane. La loro prevalenza alla nascita complessivamente risulta superiore a quella per difetti di chiusura del tubo neurale (DTN) o per sindrome di Down (OPCS, 1995). I nati affetti richiedono cure chirurgiche multidisciplinari e terapie riabilitative dalla nascita all'età adulta.

Studi embriologici, epidemiologici e genetici concorrono a indicare che la LPS, intesa come schisi labiale (LS) accompagnata o non da schisi del palato primario, e la PS, intesa come schisi del palato secondario, costituiscono entità eziologiche separate (1-3). La LPS e la PS risultano infatti dalla alterazione di distinti meccanismi embrionali che accadono in periodi diversi dello sviluppo.

Le schisi orofacciali (OFC) sono classificate secondo criteri che fanno riferimento allo sviluppo embrionale, ponendo il forame incisivo come punto di riferimento.

La LPS interessa il labbro e la parte anteriore della mascella, con o senza coinvolgimento delle rimanenti parti dure e molli del palato. La schisi anteriore completa si estende dalla base della narice, interessa il labbro e la parte alveolare della mascella, fino al forame incisivo. Si presenta come unilaterale, interessando prevalentemente il lato sinistro, o bilaterale. Questa malformazione si determina nel secondo mese di gravidanza (6^a-7^a settimana di sviluppo embrionale) per effetto di una incompleta o mancata fusione dei piani mascellari (derivanti dalle prominenze mascellari) e nasali interni (segmento intermascellare derivante dalla prominenza mediana nasale).

La PS può interessare il palato duro, unilateralmente o bilateralmente, e il palato molle, talvolta limitandosi alla sola schisi dell'ugola. Si determina tra la 8^a e la 12^a settimana di sviluppo embrionale per difetto di crescita dei processi palatini laterali che impediscono la migrazione mediana e la fusione dei piani palatini tra loro e con il setto nasale.

Le LPS e le PS si presentano prevalentemente come forme isolate, ma possono costituire una componente malformativa di oltre 300 sindromi mendeliane, cromosomiche e teratologiche.

Nella popolazione di origine caucasica, la LPS si manifesta alla nascita con prevalenza di circa 1/1000, mentre la PS ha prevalenza di circa 1/2500. Nelle LPS si registra una maggiore incidenza tra i maschi, mentre nelle PS il sesso femminile è maggiormente colpito.

Genetica delle schisi orofacciali

Numerose evidenze concorrono a indicare l'esistenza di un'importante componente genetica nell'eziologia delle forme non-sindromiche di LPS e PS. Queste sono essenzialmente riconducibili ad analisi dei rischi di ricorrenza e a studi su gemelli.

Nelle OFC isolate il rischio di ricorrenza per fratelli risulta significativamente maggiore rispetto a quanto prevedibile sulla base di aggregazione familiare di fattori ambientali (4).

Nelle LPS il rischio di ricorrenza tra fratelli è il 5% quando il probando è una femmina e il 3,9% quando è maschio. Il rischio di ricorrenza per figlio di un soggetto affetto è il 4%, che aumenta al 15% se questi presenta un fratello affetto.

Nelle PS il rischio di ricorrenza tra fratelli è il 6% quando il probando è maschio e il 2% quando è femmina. Il rischio aumenta al 20% se è presente un altro affetto tra i consanguinei di primo grado.

Studi su gemelli indicano una forte ereditabilità delle OFC. Ricerche condotte in Danimarca su gemelli con LPS isolata riportano un indice di ereditabilità di 0,73 nei maschi e 0,66 nelle femmine. La concordanza per LPS e PS è marcatamente maggiore nei gemelli monozigoti rispetto ai dizigoti ed è specifica per tipo di schisi facciale (5, 6).

La LPS e la PS si configurano come condizioni malformative a eziologia multifattoriale, la cui componente genetica è ancora in massima parte sconosciuta. È stato ipotizzato che all'eziologia delle OFC concorrano 3-4 geni maggiori di suscettibilità (7), ma è probabile che un numero esteso di geni sia coinvolto, e che nessuno di essi sia necessario e sufficiente per determinare queste malformazioni congenite. Il modello a "network" proposto da Greenspan (8), che prevede che l'esito malformativo sia raggiungibile attraverso un ampio numero di combinazioni geniche lungo una rete complessa di interazioni, trova evidenze favorevoli in studi epidemiologici su PS in popolazioni europee (Calzolari *et al.*, in stampa).

La ricerca delle cause genetiche delle OFC viene condotta seguendo molteplici approcci: analisi di linkage e di associazione, studi genetici delle forme sindromiche mendeliane e cromosomiche, studi su modelli animali, analisi di espressione genica nei tessuti coinvolti nelle schisi e studi su geni codificanti enzimi coinvolti nel metabolismo di fattori nutrizionali e di xenobiotici.

Questi studi hanno condotto alla individuazione di regioni genomiche in linkage con lo sviluppo di LPS e PS in famiglie con ricorrenza o associate ad aberrazioni cromosomiche, e all'individuazione di geni candidati su base posizionale e funzionale.

Protezione da acido folico assunto in epoca periconcezionale

Un importante fattore ambientale legato allo sviluppo delle OFC è costituito dall'apporto nutrizionale di folati.

È noto che l'assunzione periconcezionale e nel primo trimestre di gravidanza di complessi multivitaminici contenenti acido folico (AF) contribuisce a ridurre significativamente il rischio di malformazioni congenite nel nascituro. Questa vitamina B è risultata protettiva verso lo sviluppo di difetti di chiusura del tubo neurale, di cardiopatie conotruncali, di onfalocele, di difetti dei tratti urinari e di riduzione degli arti e di OFC (9).

L'effetto protettivo dei folati nei confronti della LPS e della PS è documentato da una ampia serie di studi prospettivi e di caso-controllo, che hanno successivamente trovato integrazione con studi di interazione gene-ambiente.

Già dalla fine degli anni '50 era noto che la somministrazione in gravidanza di multivitaminici comprendenti dosi di 0,5-5 mg/die di AF riduceva il rischio di ricorrenza delle OFC (10-12). Si trattava di studi non-randomizzati, che hanno avuto come oggetto madri di soggetti affetti.

In uno studio prospettivo condotto nella Repubblica Ceca su 221 donne con storia familiare di LPS (13), la somministrazione nel periodo periconcezionale di complessi multivitaminici comprendenti una dose elevata (10 mg/die) di AF ha determinato una riduzione del 65% (dal 4,1% nelle gravidanze di controllo all'1,4% nelle gravidanze con integrazione) del rischio di ricorrenza (RR) di sviluppo delle OFC (OR = 0,35, p = 0,031). Questo risultato, pur suggerendo l'esistenza di un effetto protettivo da parte dell'AF, non è conclusivo in quanto non randomizzato e non consente di valutare l'effetto indipendente delle altre componenti vitaminiche.

Uno studio prospettivo controllato doppio-cieco di somministrazione periconcezionale di integratori multivitaminici comprendenti una dose fisiologica (0,8 mg/die) di AF, condotto su base randomizzata in donne ungheresi, non ha evidenziato un significativo effetto protettivo dell'AF, probabilmente riconducibile al basso numero di casi di LPS e PS osservati (14, 15). Tuttavia, anche una successiva estensione dello studio, che ha condotto all'esame complessivo di 5488 gravidanze con integrazione e di 5821 gravidanze non-supplementate, non ha fornito indicazione di effetto protettivo da parte dell'AF (16). Questo risultato negativo è risultato in contrasto con l'esito di uno studio caso-controllo condotto nel periodo 1980-91 nella stessa popolazione (Hungarian case-control surveillance of congenital abnormalities). In questo studio si è osservata una significativa riduzione della prevalenza delle OFC associata all'assunzione nel primo trimestre di gravidanza di dosi relativamente elevate (3-9 mg/die) di AF (17).

I risultati degli studi ungheresi hanno evidenziato l'importanza della dose di AF nel fornire protezione verso lo sviluppo delle OFC. Dosi fisiologiche (< 1 mg/die) di AF non riducono la prevalenza alla nascita di LPS e PS, mentre solo dosi farmacologiche (ad esempio, 6 mg/die) di AF, somministrate nel periodo critico di sviluppo del palato primario e secondario, vengono considerate avere efficacia protettiva nei confronti dello sviluppo delle OFC (16).

In uno studio condotto in California, Shaw *et al.* (18) rilevarono che tra 332 madri che in gravidanza non assumevano integratori multivitaminici, quelle che riportavano l'uso quotidiano di cereali fortificati con AF avevano un rischio ridotto del 50% per LPS (OR = 0,50, 95% CI: 0,36-0,68) e del 27% per PS (OR = 0,73, 95% CI: 0,46-1,2). Risultati analoghi sono riportati da Mulinare *et al.* (19).

In uno studio nordamericano condotto nelle aree di Boston, Philadelphia e Toronto, Werler *et al.* (20) riscontrarono che l'assunzione in gravidanza di integratori multivitaminici contenenti AF si associava a una riduzione del 30% del rischio per LPS (OR = 0,7, 95% CI: 0,4-1,1) e del 60% per PS (OR = 0,4, 95% CI: 0,2-0,9). Un'indagine condotta nelle stesse aree da Hayes *et al.* (21) non rilevava protezione da uso dietetico di folati assunti nei 6 mesi precedenti l'ultimo periodo mestruale (LPS: OR = 1,2, 95% CI: 0,7-2,0; PS: OR = 0,9, 95% CI: 0,5-1,7).

Loffredo *et al.* (22) riportano che in Brasile l'integrazione vitaminica nei primi 4 mesi di gravidanza fornisce un significativo effetto protettivo riducendo il rischio relativo (RR) sia verso la LPS (RR = 0,58) che nei confronti della PS (RR = 0,60).

Itikala *et al.* (23) in un ampio studio di popolazione caso-controllo condotto ad Atlanta e che copre il periodo 1968-1980, riportano una riduzione del 48% del rischio per LPS (OR = 0,52, 95% CI: 0,34-0,80) e del 19% per PS (OR = 0,81, 95% CI: 0,44-1,52) in madri che hanno assunto regolarmente (almeno 3 volte alla settimana) integratori multivitaminici contenenti 0,4 mg di AF. In questa popolazione l'integrazione in gravidanza con una dose fisiologica di AF è risultata conferire una significativa protezione nei confronti della LPS e una riduzione della prevalenza di PS. L'effetto protettivo verso la PS, non statisticamente significativo probabilmente in conseguenza del numero relativamente limitato di casi osservati, è risultato minore rispetto a quanto osservato nello studio di Werler *et al.* (20), ma paragonabile a quello riscontrato in California da Shaw *et al.* (18). È possibile che la diversità nella dose di risposta alla somministrazione di AF sia riconducibile a differenze genetiche tra le popolazioni esaminate (23).

I dati degli studi prospettivi e gli studi di popolazione caso-controllo sono schematizzati nella Tabella 1.

Tabella 1. Protezione da AF: studi prospettivi controllati (A) e studi caso-controllo (B)

Paesi	Integrazione	Rischio relativo (95% CI)	Riferimenti bibliografici
<i>A: studi prospettivi controllati</i>			
Ungheria	Multivitamine con 0,8 mg AF	LPS: 1,94 (0,41-9,09) PS: 0,19 (0,01-4,03)	(14)
Repubblica Ceca	10 mg AFe multivitamine	LPS: 0,36 (p = 0,031)	(13)
Ungheria	Multivitamine con 0,8 mg AF	LPS: 1,54 (0,48-5,30) PS: 0,35 (0,05-2,40)	(16)
<i>B: studi caso-controllo</i>			
California	Multivitamine con 0,4 mg AF o 0,8 mg AF	LPS: 0,50 (0,36-0,68) PS: 0,73 (0,46-1,2)	(18)
Boston, Philadelphia, Toronto	Multivitamine o AF	LPS: 1,3 (0,8-2,1) PS: 0,9 (0,5-1,6)	(21)
Ungheria	3-9 mg AF	LPS: 0,81 (0,67-0,98) PS: 0,74 (0,55-0,99)	(17)
Boston Philadelphia, Toronto	Multivitamine	LPS: 0,7 (0,4-1,1) PS: 0,4 (0,2-0,9)	(20)
Brasile	Multivitamine	LPS: 0,58 (p < 0,001) PS: 0,60 (p < 0,05)	(22)
Atlanta	Multivitamine con 0,4 mg AF	LPS: 0,52 (0,34-0,80) PS: 0,81 (0,44-1,52)	(23)

Lo studio di Atlanta fornisce importanti informazioni sull'effetto differenziale che ha l'integrazione multivitaminica a seconda dell'assunzione nei diversi periodi gestazionali. La protezione verso la LPS e la PS risulta essere nulla quando l'assunzione di integratori multivitaminici viene avviata dal secondo o terzo mese di gravidanza (OR = 0,99, 95% CI: 0,96-1,43), mentre l'effetto protettivo si manifesta solo quando l'integrazione di multivitaminici viene avviata nel periodo periconcezionale o nel primo periodo postconcezionale. I periodi di inizio dell'assunzione di integratori multivitaminici comprendenti AF sono indicati da Itikala *et al.* (2001) (23).

Gli studi caso-controllo condotti denotano alcune generali limitazioni: non consentono di distinguere l'effetto dell'AF da quello di altre vitamine contenute nelle formulazioni multivitaminiche, in particolare delle vitamine B12 e B6, e non stabiliscono in modo conclusivo l'importanza preventiva del dosaggio di AF. Considerando che la diversità delle stime di effetto protettivo verso LPS e PS nelle varie popolazioni potrebbe essere riconducibile alle differenze nel loro *background* genetico, è accettato ritenere che la carenza di AF sia un fattore di rischio per le OFC isolate, e che la neutralizzazione mediante integrazione dietetica durante i primi mesi di gravidanza conferisca protezione verso la LPS e la PS.

A questa affermazione possono conseguire implicazioni importanti in termini di economia sanitaria. Prendendo come riferimento i dati forniti dall'ampio studio svolto ad Atlanta (23), considerando che l'uso di integratori multivitaminici fornisca il 48% di protezione verso lo

sviluppo di LPS e che l'uso di integratori multivitaminici nei controlli sia del 26%, si calcola che potenzialmente il loro utilizzo previene il 13% dei casi di LPS. Questa percentuale potrebbe aumentare se la prevalenza di uso di integratori multivitaminici venisse incrementata attraverso un adeguato piano di prevenzione.

Associazione con l'uso di antagonisti dei folati

L'effetto della somministrazione dell'AF nel ridurre il rischio di malformazioni congenite non è conclusivamente accertato, dal momento che i complessi multivitaminici contengono solitamente oltre 15 vitamine e minerali. Un approccio per valutare il ruolo dell'AF nel ridurre la prevalenza di malformazioni congenite è di determinare se gli antagonisti dell'AF siano associati ad aumento di difetti congeniti.

Gli antagonisti dell'AF si possono ricondurre a due gruppi:

inibitori dell'enzima Dihidrofolato-Reduttasi (DHF-R), quali aminopterin, methotrexate, sulfasalazine, pyrimethamine, triamterene e trimethoprim, che spostano il folato dall'enzima DHFR determinando il blocco della conversione di folati in metaboliti più attivi;

farmaci che agiscono alterando altri enzimi del metabolismo dei folati, impedendo l'assorbimento dei folati e aumentandone la degradazione. Corrispondono principalmente a farmaci antiepilettici, quali carbamazepine, phenytoin, primidone e phenobarbital.

In uno studio caso-controllo condotto nel Nord-America l'analisi di 1962 madri di soggetti affetti da OFC e di 8387 madri di controllo ha evidenziato che l'esposizione ad antagonisti dell'AF durante il secondo e terzo mese successivo all'ultima mestruazione determinava un aumentato rischio di sviluppare OFC nel nascituro (24). Lo stesso autore (24) ha rilevato che il rischio relativo risultava di 2,6 (95% CI: 1,1-6,1) per inibitori della DHFR e di 2,5 (95% CI: 1,5-4,2) per farmaci antiepilettici. In assenza di integrazione multivitaminica il rischio relativo aumentava a 4,9 (95% CI: 1,5-16,7) per esposizione a inibitori della DHFR, mentre non incrementava con esposizione ad antiepilettici (OR = 2,3; 95% CI: 1,2-4,4).

Questo studio evidenzia che l'uso di multivitaminici contenenti AF ha efficacia nel diminuire gli effetti degli inibitori della DHFR ma non quello dei farmaci antiepilettici, e fornisce un'evidenza indiretta dell'effetto protettivo dell'acido folico verso lo sviluppo delle OFC.

Protezione da folati in modelli sperimentali animali

Secondo Johnston e Millicovsky (25) gli embrioni che sviluppano OFC si trovano in prossimità di un ipotetico livello soglia, e minimi miglioramenti ambientali, come la dieta della madre durante la gravidanza sono sufficienti per prevenire lo sviluppo della malformazione.

L'uso di animali geneticamente predisposti allo sviluppo di LPS o PS fornisce un modello sperimentale per studiare l'effetto protettivo dell'AF verso queste malformazioni congenite. Due studi, condotti rispettivamente su topi che presentano LPS spontanea (26) e su ratti che sviluppano PS indotta da procarbazina (27), forniscono ulteriore evidenza dell'effetto protettivo dei folati nei confronti delle OFC.

I topi di ceppo A/WySn presentano LPS nel 25-35% dei nati, e l'incidenza della malformazione aumenta ulteriormente se prima della gestazione gli animali sono mantenuti in dieta scarsa di folati (28). In questi topi si è riscontrata una minore proliferazione cellulare a livello del mesenchima e dell'epitelio delle prominenze nasali (29) rispetto al ceppo di controllo

A/J, che ha minore frequenza di LPS, o a ceppi di topi senza predisposizione a LPS. Si ritiene che il minore sviluppo della prominenza nasale o la ridotta proliferazione epiteliale nei topi A/WySn determini un minore contatto e predisponga allo sviluppo di schisi labiale.

La somministrazione di AF (12 mg/die) nel periodo critico per lo sviluppo facciale (8,5-9,5 giorni di gestazione) riduce significativamente la frequenza di LPS nei feti dal 40,0% (non-trattati) al 10,2% ($p < 0,001$) (26), dimostrando che l'aumento di folati plasmatici (da 0,3 mg/ml a 4,4 mg/ml) mediante somministrazione di AF in gravidanza determina protezione contro lo sviluppo di LPS in animali geneticamente predisposti (26).

L'effetto protettivo dell'AF verso la PS è stato studiato da Bienengraber *et al.* (27) su ratti Lew 1A. Questo ceppo sviluppa PS nel 90% dei feti di animali esposti a procarbazine (200 mg/kg) al 14° giorno gestazionale. Il trattamento con AF (4 mg/kg dal 14° al 17° giorno di gestazione) non risulta proteggere dallo sviluppo della PS, ma determina una marcata e significativa riduzione dei casi con PS completa (27). Nella maggior parte degli animali trattati con procarbazine e AF la schisi si limita al palato duro, che corrisponde alla porzione del palato secondario che per prima va incontro a fusione durante lo sviluppo embrionale. È rilevante notare che l'effetto protettivo dell'AF si manifesta solo verso la chiusura del palato molle, indicando che fattori distinti governano la chiusura delle diverse porzioni del palato secondario.

Livelli di folati e omocisteina in madri di affetti da schisi orofacciali

Un approccio diretto verso la valutazione dell'importanza dei folati nella prevenzione delle OFC viene dall'analisi del livello di questi metabolici in madri di soggetti affetti.

Uno studio condotto nelle Filippine rivela che madri di individui con OFC non-sindromico presentano livelli di folati eritrocitari significativamente maggiori (413,3 ng/ml) rispetto al controllo, mentre i folati plasmatici rimangono a livelli normali (30).

In uno studio condotto in Olanda, Wong *et al.* (31) riportano che le madri di affetti da LPS presentano un significativo aumento dei livelli plasmatici di omocisteina, sia a digiuno che dopo caricamento di metionina, accompagnato da incremento dei folati serici ed eritrocitari, riduzione dei livelli di vitamina B6 e invariati livelli di vitamina B12 (Tabella 2). Focalizzando l'attenzione sui casi con omocisteminemia al di sopra del 97,5 percentile del gruppo di controllo (19,1 μM a digiuno, 50,1 μM dopo carico di metionina), questi si presentano molto più frequentemente tra le madri di affetti da LPS rispetto che tra i controlli (OR = 5,3, $p = 0,03$), suggerendo una possibile associazione causale tra alterazione del metabolismo dei folati nelle madri e sviluppo di LPS nei figli.

Tabella 2. Livelli ematici di omocisteina e vitamine in madri di affetti da LPS e in controlli (31)

Livelli ematici	Casi di LPS (35)		Controlli (56)		Significatività
Omocisteina a digiuno (μM)	12	(9-21)	9	(6-19)	< 0,01
Omocisteina dopo carico di Metionina (μM)	35	(23-92)	31	(20-55)	< 0,05
Folati serici (nM)	16	(9-52)	13	(7-25)	< 0,01
Folati eritrocitari (nM)	550	(330-1200)	490	(310-1000)	< 0,05
Vitamina B12 serica (pM)	240	(110-660)	270	(93-580)	Non significativo
Vitamina B6 ematica (nM)	41	(25-98)	52	(19-77)	< 0,05

Tra i risultati di questo studio risulta insolito il riscontro contemporaneo di iperomocisteinemia e di alti livelli di folati, essendoci generalmente una correlazione inversa tra essi, in condizioni di digiuno. Il dato potrebbe essere spiegato dalla presenza nelle madri di affetti da LPS, di difetti in geni coinvolti nel metabolismo dei folati, come l'omozigosi TT per il polimorfismo 677CT-MTHF-R, che causa aumento dei folati serici, riduzione dei folati RBC e aumento dell'omocisteinemia (32). L'aumento dell'omocisteina serica nelle madri di affetti da LPS non è spiegabile con i livelli di vitB12, essendo questi invariati rispetto al controllo.

L'iperomocisteinemia nelle madri di affetti da LPS potrebbe spiegarsi anche con la presenza di difetti metabolici relativi al piridossal-fosfato. L'osservata riduzione di vitB6 ematica potrebbe avere per conseguenza una riduzione dell'attività dell'enzima Cistationina-β-Sintasi (CBS), determinando in ultimo elevati livelli di omocisteina dopo carico di metionina.

Alterazioni del metabolismo dei folati

L'effetto protettivo dell'AF verso lo sviluppo delle OFC in associazione a trattamenti con inibitori della DHFR o in modelli animali può essere interpretato come una azione compensativa nei confronti di un deficit nel metabolismo dei folati. Inoltre, l'evidenza di alterazioni nei parametri ematici dell'omocisteina e dei folati in madri di affetti da LPS o PS suggerisce la possibilità che parte della predisposizione genetica allo sviluppo di queste malformazioni congenite possa essere riconducibile a mutazioni in geni codificanti enzimi del metabolismo dei folati e dell'omocisteina. La somministrazione dell'AF nel corso della gravidanza potrebbe compensare lo sbilanciamento nel metabolismo dei folati in soggetti predisposti, riducendo quindi il rischio di sviluppare l'OFC.

La concentrazione ematica di omocisteina costituisce il marcatore più sensibile dello stato dei folati e delle disponibilità di vitamine B12 e B6. L'omocisteina costituisce il substrato per gli enzimi CBS e Metionina Sintasi (MS), e una riduzione delle reazioni di rimetilazione e transulfurazione può determinare l'accumulo di omocisteina (Figura 1A).

L'efficienza della reazione di transulfurazione dell'omocisteina è dipendente dalla attività della CBS e dalla disponibilità di vitamina B6. La rimetilazione dell'omocisteina può essere ostacolata da deficit di vitamina B12, alterazioni nell'enzima MS, nell'attività della sua specifica reduttasi (MSR), o nella disponibilità del donatore del gruppo metilico, il metil-tetraidrofolato (metil-THF). Questo viene prodotto da una reduttasi (MTHF-R) per la quale sono note varianti genetiche (677CT e 1298AC) che ne determinano una diminuita attività catalitica. La riduzione dell'apporto di metil-THF potrebbe essere conseguenza anche da difetti localizzati più a monte nel ciclo dei folati, coinvolgendo gli enzimi SHMT, MTHFDH/MTHFCH/FTHFS e MTHFS (Figura 1A).

Difetti nella rimetilazione dell'omocisteina hanno come conseguenza la riduzione della sintesi *de novo* di S-adenosil metionina (SAM), il principale donatore di gruppi metilici nelle reazioni cellulari, che può determinare un impedimento nella metilazione di siti CpG associati a promotori e causare alterazioni nell'espressione di genica. L'effetto può essere aumentato dall'accumulo di S-adenosil omocisteina (SAH), che tende a inibire l'attività di metil-trasferasi. L'accumulo di omocisteina può determinare anche tossicità tessutale associata alla sua ossidazione, o ad alterazione di funzioni cellulari per omocisteinizzazione di specifiche proteine (Figura 1B). Tutti questi effetti potrebbero essere alla base dello sviluppo di malformazioni congenite riscontrate in associazione a iperomocisteinemia.

La mutazione missenso 677TC (A222V) determina la sintesi un enzima termolabile, con attività catalitica che negli omozigoti TT è diminuita del 50-60% (a 37°C) (33). In condizioni di insufficiente apporto alimentare di folati gli omozigoti 677CT manifestano una riduzione dei livelli di folati plasmatici, aumento dei folati eritrocitari e una moderata iperomocisteinemia (32, 34). Gli eterozigoti CT hanno attività MTHF-R intermedia.

Una seconda mutazione, 1298AC, determina in omozigosi una riduzione dell'attività MTHF-R, seppur non accompagnata da incremento dei livelli plasmatici di omocisteina (35, 36). Gli eterozigoti composti 677CT/1298AC presentano un profilo biochimico simile a quello degli omozigoti TT per 677CT-MTHF-R, con aumentati livelli di omocisteina e ridotti livelli di folati nel siero (35).

La frequenza genica della mutazione 677CT varia ampiamente a seconda dei gruppi etnici. Si manifesta particolarmente frequente in Italia (43,8%) e tra gli ispanici della California (41,7%), con prevalenza degli omozigoti TT rispettivamente del 18% e del 20,7%. La mutazione ha frequenza bassa tra i neri americani (14,0%, TT: 1,2%) e nelle regioni dell'Africa sub-sahariana (6,3%, TT: 0,4%) (37). In Europa la frequenza degli omozigoti TT varia dall'8% in Germania al 18% in Italia. In Italia gli omozigoti TT hanno massima frequenza in Toscana (30,2%), dove la frequenza dell'allele T (52,8%) supera quello dell'allele C (37).

L'allele A1298C ha frequenza del 9% in Canada (35) e Olanda (36), con frequenza di eterozigoti C677T/A1298C del 15% e del 20 % rispettivamente.

È ben documentato che il rischio di sviluppare DTN è associato al genotipo MTHF-R, in dipendenza dello stato nutrizionale. Esistono inoltre evidenze che dimostrano che il rischio per DTN aumenta in combinazioni genotipiche tra il gene MTHF-R (677CT) e i geni CBS (38), MS (39, 40) e MSR (41), indicando come l'interazione tra geni del metabolismo dei folati possa giocare un ruolo importante nel determinare lo sviluppo di malformazioni congenite.

L'alta frequenza della mutazione 677CT, soprattutto nelle popolazioni mediterranee, sorprende se si considera la sua associazione con un aumentato rischio di malattia trombotica e di sviluppare DTN negli omozigoti TT. Una spiegazione potrebbe essere ricondotta a una migliore resistenza verso neoplasie come il carcinoma al colon (42) o da un vantaggio selettivo degli eterozigoti CT in condizioni di deprivazione alimentare (43). Gli effetti clinici della mutazione 677CT risultano comunque molto moderati, e la derivazione genetica potrebbe avere compensato la selezione negativa.

La possibile associazione tra la mutazione 677CT-MTHF-R e lo sviluppo delle OFC è stata oggetto di due recenti studi caso-controllo condotti in California (44) e in Irlanda (45).

Il rapporto di Shaw *et al.* (44), riferito a una coorte di 310 nati in California nel periodo 1987-1989 per i quali è stato analizzato il genotipo MTHF-R e sono stati raccolti dati sull'uso in gravidanza di integratori vitaminici contenenti AF, non rivela differenze di frequenze genotipiche tra casi e controlli in confronti stratificati in gruppi a seconda dell'uso periconcezionale di multivitaminici delle madri o senza. Nello studio non si osserva un aumentato rischio di LPS negli omozigoti TT e non si evidenzia una interazione tra il genotipo 677CT-MTHF-R e l'uso periconcezionale di multivitaminici nella madre. L'analisi statistica era tuttavia ristretta al confronto tra genotipi all'interno di gruppi con la stessa storia di uso di multivitaminici in epoca periconcezionale. Nel rapporto non è stato formalmente analizzato l'effetto principale dell'uso di multivitaminici o del genotipo, né è stata valutata la possibilità di una interazione gene-ambiente.

Rianalizzando i dati di Shaw *et al.* (44), usando la regressione logistica basata su un singolo gruppo di riferimento (omozigoti CC di madri con uso di integratori multivitaminici), Wyszynski e Diehl (46), hanno riscontrato che il mancato uso di multivitaminici si associa ad aumentato rischio di LPS, con differenze statisticamente significative in due (CC, TT) dei tre genotipi (44). L'effetto complessivo dell'uso di multivitaminici, aggiustato per il genotipo MTHF-R, è

statisticamente significativo ($p = 0,03$, OR: 2,30, 95% CI: 1,56-3,40), con un aumentato rischio di LPS associato al non uso di multivitaminici (OR: 4,0, CI: 1,5-14,0). Il rischio di LPS cala leggermente negli omozigoti TT rispetto ai CC di madri con integrazione multivitaminica, mentre aumenta nei TT di madri senza integrazione. Questa rianalisi sostiene l'ipotesi che il consumo di integratori multivitaminici prima e all'inizio della gravidanza eserciti un ruolo protettivo verso lo sviluppo di LPS. Non risulta un effetto significativo attribuibile al genotipo MTHF-R, ma piccole differenze in rischio tra i genotipi risultano in direzione opposta per gli utilizzatori rispetto ai non-utilizzatori di multivitaminici, suggerendo una interazione gene-ambiente. L'analisi di interazione gene-ambiente richiede campioni di dimensioni molto estese, e la non significatività riscontrata è probabilmente riconducibile alla modesta dimensione del campione.

Diversamente dallo studio californiano (44), lo studio caso-controllo condotto da Mills *et al.* (45), in Irlanda è risultato essere una significativa associazione tra il polimorfismo 677CT-MTHF-R e lo sviluppo delle OFC isolate.

Nello studio di Mills *et al.* (45), condotto su una popolazione con uso periconcezionale di integratori vitaminici molto basso, il controllo era inquadrato all'interno di un programma di *screening* di popolazione che coinvolgeva tutti i nati in Irlanda. Tra i casi sono stati esclusi i soggetti con anomalie cromosomiche, con malformazioni associate e con genitore affetto da OFC. Nei controlli il genotipo TT risultava con una frequenza del 9,8%, mentre tra i casi di PS isolata era circa 3 volte maggiore (25,9%, OR: 3,23 95% CI: 1,32-7,86, $p = 0,02$). Il genotipo TT si presentava aumentato anche tra i casi di LPS (15,2%, OR: 1,65 95% CI: 0,81-3,35, $p = 0,20$), tuttavia la differenza con il controllo non era significativa (45). Considerando complessivamente i casi di OFC, la prevalenza del genotipo TT risulta comunque significativamente più alta che nel controllo. L'inclusione dei casi di OFC associata ad altre malformazioni non modificava i risultati.

Il significativo aumento della frequenza del genotipo TT tra i casi di PS nella popolazione irlandese costituisce una indicazione verso un ruolo eziopatogenetico svolto dalla mutazione 677CT-MTHF-R. Lo studio di Mills *et al.* (45) è il primo che dimostra che la presenza del genotipo TT costituisce un fattore di rischio per OFC e suggerisce che anomalie del metabolismo dei folati nell'embrione possono avere un ruolo eziologico nel determinare forme isolate di OFC nella popolazione irlandese. Si può ipotizzare che l'efficacia preventiva della somministrazione di AF in epoca periconcezionale e nei primi mesi di gravidanza possa essere riconducibile al superamento dell'alterazione metabolica determinata dalla variante termolabile di MTHF-R.

Le differenze tra i risultati dello studio di Mills *et al.* (45) e quello di Shaw *et al.* (44) possono essere ricondotte alle diverse caratteristiche delle due popolazioni oggetto dell'analisi. La popolazione irlandese è geneticamente molto diversa e omogenea rispetto a quella californiana. Presentando una minore variabilità del pool genico è maggiormente verosimile che in questa popolazione lo stesso gene possa determinare la suscettibilità allo sviluppo della malformazione. Inoltre, la popolazione considerata dallo studio di Mills *et al.* è caratterizzata da tasso di consumo di vitamine particolarmente basso. In California il genotipo TT manifesta un rischio relativo per LPS minore di 1, ma se la casistica viene ristretta ai non-ispanici senza integrazione con multivitaminici, i risultati appaiono simili a quelli ottenuti nella popolazione irlandese: il rischio relativo per il genotipo TT rispetto a CC risulta di 1,8, anche se non statisticamente significativo.

L'analisi del *trend* temporale della prevalenza di OFC a Dublino dall'introduzione della fortificazione dei cereali e della integrazione vitaminica mostra una lieve decrescita, molto minore rispetto a quella riferita alla prevalenza alla nascita di DTN. Considerano che il rischio di ambedue queste malformazioni è influenzato dall'apporto di folati e dal genotipo MTHF-R, questa differenza potrebbe essere spiegata ipotizzando che la dose di AF necessaria per prevenire le OFC sia maggiore rispetto a quella di 400 $\mu\text{g}/\text{die}$ raccomandata per prevenire i DTN (16).

Interazione materno-fetale

Da uno studio condotto da Martinelli *et al.* (47) su una casistica con ricorrenza familiare di OFC, l'applicazione del *transmission distortion test* a 64 triadi composte da affetti da LPS e dai loro genitori, di 64 pazienti con LPS non ha evidenziato la presenza di *linkage disequilibrium* con la trasmissione dell'allele T del polimorfismo 677CT-MTHF-R.

Tuttavia, si è riscontrato che le madri dei soggetti affetti manifestano un'alta frequenza dei genotipi CT (OR: 2,75, 95% CI: 1,30-5,57) e TT (OR: 2,51, 95% CI: 1,00-6,14). Questa evidenza suggerisce una importanza del genotipo materno piuttosto che del genotipo embrionale nell'eziologia della LPS. Il maggiore rischio relativo riscontrato per il genotipo CT potrebbe essere spiegato da una maggiore mortalità fetale in madri TT, oppure da una tendenza a generare figli affetti da LPS in associazione ad altre malformazioni.

L'effetto dell'interazione tra genotipo materno e sviluppo di LPS rilevato da Martinelli *et al.* (47) trova sostegno dall'evidenza di moderata iperomocisteinemia materna associata a rischio per LPS riportata da Wong *et al.* (31), una condizione che si ritrova con frequenza aumentata tra gli omozigoti TT (32).

Prevenzione delle schisi orofacciali

Le forme isolate di LPS e PS costituiscono condizioni a eziologia multifattoriale determinate dall'interazione tra fattori genetici e ambientali. Numerose evidenze concorrono a indicare che parte della componente causale di queste malformazioni interessa direttamente il metabolismo dei folati. I folati prevengono le OFC in animali con predisposizione alla LPS o alla PS; gli antagonisti della DHF-R determinano un aumento di incidenza di OFC, in parte prevenibile da somministrazione di AF. In generale si riconosce che l'integrazione periconcezionale con AF tende a ridurre il rischio di OFC, ma la dose raccomandata per prevenire i DTN (0,4 mg/die) risulta avere varia efficacia a seconda delle diverse popolazioni in cui è applicata, probabilmente in dipendenza delle diverse caratteristiche genotipiche che le contraddistinguono.

Il genotipo TT del polimorfismo 677CT-MTHF-R risulta conferire un rischio aumentato di OFC, specialmente in condizioni in cui l'apporto di folati in gravidanza non è ottimale, ma la sua diffusione, elevata soprattutto nelle popolazioni mediterranee, non correla con la prevalenza della malformazione, e non è possibile attribuirle un ruolo essenziale nell'eziologia delle OFC. Ci sono evidenze che suggeriscono che l'importanza di questo polimorfismo nell'eziologia della LPS potrebbe essere più rilevante se riferita al genotipo materno piuttosto che a quello dell'embrione, e che il suo effetto possa essere associato a uno stato di iperomocisteinemia nelle madri di soggetti affetti.

L'iperomocisteinemia nelle madri può essere conseguenza di alterazioni nell'attività di geni del metabolismo dei folati e dell'omocisteina che possono dipendere da mutazioni in geni diversi dalla MTHF-R, quali la SHMT, la MTHFDH/MTHFCH/FTHFS, MTHFS, la MS, la MSR e la CBS. Tuttavia, al momento, non sono noti dati di associazione tra polimorfismi di questi geni e lo sviluppo di OFC, e soprattutto non è nota la loro azione combinata. È infatti verosimile ritenere che nessuno di questi geni possieda varianti polimorfiche che da sole possano conferire un rischio sensibilmente alto di sviluppare LPS o PS, ma piuttosto si può prevedere che combinazioni genotipiche complesse, che interessano più geni del metabolismo dei folati, possano eventualmente avere un ruolo rilevante nell'eziologia di queste malformazioni craniofacciali, e che questo si eserciti con un rapporto di interazione tra genotipo

materno e genotipo dell'embrione, e in dipendenza dell'apporto ottimale di folati nella madre durante i primi mesi di gravidanza.

L'incompletezza di informazioni sul ruolo dei folati nelle OFC rende impraticabile l'esecuzione di test genetici volti a individuare gravidanze con rischio aumentato. La genotipizzazione riferita alla mutazione 677CT-MTHF-R è assolutamente insufficiente. A scopo preventivo si può comunque raccomandare alle madri l'assunzione nel periodo periconcezionale e nei primi mesi di gravidanza di dosi sufficienti di AF, accompagnate dall'astensione all'esposizione a fattori di rischio ambientale, quali il fumo e l'alcol.

Ci sono indicazioni che la dose sufficiente a determinare un effetto protettivo verso lo sviluppo di LPS e PS possa essere superiore a quella di 0,4 mg/die risultata efficace per prevenire i DTN. L'aumento del dosaggio del folato potrebbe superare questa incertezza, ma potrebbe al contempo accentuare l'effetto collaterale di incrementare le gravidanze multiple. La supplementazione periconcezionale con folati è risultata infatti determinare un incremento relativo del tasso concezionale, e un sensibile aumento delle gravidanze gemellari (48). Si ipotizza che l'effetto sia riconducibile alla facilitazione della sopravvivenza embrionale nelle prime fasi della gestazione, piuttosto che a una aumentata ovulazione (49). Dal momento che le condizioni di salute e di sviluppo dei gemelli sono relativamente sfavorevoli rispetto ai nati singoli, l'aumento del tasso di gravidanze gemellari può comportare conseguenze negative in termini di salute pubblica. Questo effetto indesiderato deve essere considerato quando si stabiliscono strategie di prevenzione basate su raccomandazioni all'integrazione periconcezionale con AF fornite in modo generalizzato.

È auspicabile che la ricerca nel breve periodo possa portare all'individuazione dei fattori genetici di suscettibilità allo sviluppo delle OFC isolate, e che la strategia preventiva possa essere applicata in modo mirato in relazione alle particolari combinazioni genotipiche e alle specifiche condizioni ambientali.

Bibliografia

- 1) Fogh-Andersen P. *Inheritance of harelip and cleft palate: contribution to the elucidation of the etiology of the congenital defects of the face*. Copenhagen: Rusck, Dissertation; 1942.
- 2) Mossey PA, McColl JH, Stirrups DRS. Differentiation between cleft lip with or without cleft palate and isolated cleft palate using parental cephalometric parameters. *Cleft Palate Craniof J* 1997;34:1-10.
- 3) Fraser FC. Thoughts on the etiology of clefts of the palate and lip. *Acta Genet* 1955;5:358-69.
- 4) Tolarova M. A study of the incidence, sex-ratio, laterality and clinical severity in 3,660 probands with facial clefts in Czechoslovakia. *Acta Chir Plast* 1987;29(2):77-87.
- 5) Little J, Bryan E. Congenital anomalies in twins. *Semin Perinatol* 1986;10(1):50-64.
- 6) Christensen K, Fogh-Andersen P. Cleft lip (+/- cleft palate) in Danish twins, 1970-1990. *Am J Med Genet* 1993;47(6):910-6.
- 7) Fitzpatrick D, Farrell M. An estimation of the number of susceptibility loci for isolated cleft palate. *J Craniofac Genet Dev Bio* 1993;13(4):230-5.
- 8) Greenspan RJ. The flexible genome. *Nat Rev Genet* 2001;2(5):383-7.
- 9) Fishman MA. Birth Defects and Supplemental Vitamins. *Curr Treat Opinions Neurol* 2000;2(2): 117-22.
- 10) Conway H. Effect of supplemental vitamin therapy on the limitation of incidence of cleft lip and cleft palate in humans. *Plast Reconstr Surg* 1958;22:450-3.

- 11) Douglas B. The role of environmental factors in etiology of “so called” congenital malformations. II. *Plast Reconstr Surg* 1958;22:214-29.
- 12) Briggs RM. Vitamin supplementation as a possible factor in the incidence of cleft lip/palate deformities in humans. *Clin Plast Surg* 1976;3:647-52.
- 13) Tolarova M, Harris J. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology* 1995;51(2):71-8.
- 14) Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327(26):1832-5.
- 15) Czeizel AE. Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation. *Br Med J* 1993;306:1645-8.
- 16) Czeizel AE, Timar L., Sarkozi A. Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Pediatrics* 1999;104, 6: e66.
- 17) Czeizel AE, Toth M, Rockenbauer M. Population-based case-control study of folic acid supplementation during pregnancy. *Teratology* 1996;553:345-51.
- 18) Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, O’Malley CD, Tolarova MM. Risk of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet* 1995;346:393-6.
- 19) Mulinare J, Erickson JD, James LM, Berry RJ. Does periconceptional use of multivitamin reduce the occurrence of birth defects? *Am J Epidemiol* 1995;141:S3.
- 20) Werler MM, Hayes C, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA. Multivitamin supplementation and risk of birth defects. *Am J Epidemiol* 1999;150(7):675-82.
- 21) Hayes C, Werler MM, Willett WC, Mitchell AA. Case-control study of periconceptional folic acid supplementation and oral clefts. *Am J Epidemiol* 1996;142:1229-34.
- 22) Loffredo LCM, Souza JMP, Freitas JAS, Mossey PA. Oral clefts and vitamin supplementation. *Cleft Palate Craniof J* 2001;38(1):76-83.
- 23) Itikala PR, Watkins ML, Mulinare J, Moore CA, Liu Y. Maternal multivitamin use and orofacial clefts in offspring. *Teratology* 2001;63:79-86.
- 24) Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 2000;343(22):1608-14.
- 25) Johnston MC, Millicovsky G. Normal and abnormal development of lip and palate. *Clinic Plastic Surg* 1985;12:521-32.
- 26) Paros A, Beck SL. Folinic acid reduces cleft lip in A/wⁿ Sn mice. *Teratology* 1999;60:344-7.
- 27) Bienengraber V, Malek FA, Moritz KU, Fanghanel J, Gundlach KKH, Weingartner J. *Cleft Palate Craniof J* 2001;38(4):393-8.
- 28) Lidral AC, Johnston MC, Switzer R. The relationship between vitamins and the prevalence of cleft lip in ice. *J Dent Res* 1991;68:254.
- 29) Forbes DP, Steffek AJ, Klepacki M. Reduced epithelial surface activity is related to a higher incidence of facial clefting in A/Jw^ySn mice. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1989;9:271-83.
- 30) Munger RG, Romitti PA, Daackhirsch S, Burns TL, Murray JC, Hanson J. Maternal alcohol use and the risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology* 1996;54:27-33.
- 31) Wong WY, Eskes TK, Kuijpers-Jagtman AM, Spauwen PH, Steegers EA, Thomas CM, Hamel BC, Blom HJ, Steegers-Theunissen RP. Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. *Teratology* 1999;60(5):253-7.

- 32) van der Put NMJ, Steeger-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels JMF, Eskes TKAB, van den Heuvel LPWJ, Mariman ECM, Heyer den M, Rozen R, Blom HJ. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346:1070-1.
- 33) Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHF-R). *Thromb Haemost* 1997;78:523-6.
- 34) Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
- 35) Weisberg I, Tran P, Christensen B. A second genetic polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHF-R) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169-72.
- 36) van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-51.
- 37) Botto LD, Yang Q. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variant and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000;151(9):862-77.
- 38) Ramsbottom D, Scott JM, Molloy A. Are common mutation in cystathionine beta-synthase involved in the aetiology of neural tube defects? *Clin Genet* 1997;51:39-42.
- 39) Trembath D, Sherbondy AL, Vandyke DC, Shaw GM, Todoroff K, Lammer EJ, Finnel RH, Marker S, Lerner G, Murray JC. Analysis of select folate pathway genes, PAX3, and human T in a Midwestern neural tube defect population. *Teratology* 1999;59(5):331-41.
- 40) Christensen B, Arbour L, Tran P. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate level in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet* 1999;84: 151-7.
- 41) Wilson A, Platt R, Wu Q. A common variant in the methionine synthase reductase combined with low cobalamina (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 1999;67:317-23.
- 42) Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Spiegelman D. A Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56:4862-4.
- 43) Engbersen AMT, Franken DG, Boers GJH, Stevens EMB, Trijbels FJM, Blom HJ. Termolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hypohomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 1995;56:142-50.
- 44) Shaw GM, Rozen R, Finnel RH. Infant C677T mutation in MTHF-R, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip. *Am J Med Genet* 1998;80:196-8.
- 45) Mills JL, Kirke PN, Molloy AM. Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am J Med Genet* 1999;86:71-4.
- 46) Wyszynski DF, Diehl SR. Infant C677T mutation in MTHF-R, maternal periconceptional vitamin use, and risk of nonsyndromic cleft lip. *Am J Med Genet* 2000;92:79-80.
- 47) Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Stabellini G, Bisceglia L, Gombos F, Tognon M. C677T variant form at the MTHF-R gene and CL/P: a risk factor for mothers? *Am J Med Genet* 2001;98:357-60.
- 48) Czeizel AE, Metneki J, Dudas I. The higher rate of multiple births after periconceptional multivitamin supplementation: an analysis of causes. *Acta Genet Med Gemellol* 1994;43:175-84.
- 49) Lumley J, Watson L, Watson M, Bower C. Modelling the potential impact of population-wide periconceptional folate/multivitamin supplementation on multiple births. *Br J Obstetr Gynaecol* 2001;108:937-42.

FATTORI METABOLICI DI RISCHIO PER MALFORMAZIONI CONGENITE E SINDROME DI DOWN: IL RUOLO DELL'OMOCISTEINA

Iris Scala, Roberto Brancaccio, Generoso Andria, Gianfranco Sebastio
Dipartimento di Pediatria, Università degli Studi "Federico II", Napoli

Introduzione

L'omocisteina, un aminoacido solforato non incorporato nella sequenza proteica, è stata oggetto di numerosi studi relativi a diverse patologie umane. In particolare, aumenti dei livelli plasmatici di omocisteina, anche in misura moderata, sono stati associati a condizioni multifattoriali diverse, quali: 1) malattie cardiovascolari da occlusione arteriosa o trombosi venosa, causate da un effetto dell'omocisteina sulla struttura della parete vascolare e sul sistema di coagulazione del sangue; 2) malformazioni congenite tra cui difetti del tubo neurale (DTN), difetti cardiaci, labiopalatoschisi (LPS), difetti trasversi degli arti; 3) sindrome di Down, la cui possibile associazione con una condizione di iperomocisteinemia moderata è stata recentemente postulata. L'interesse crescente della comunità scientifica nei riguardi dell'omocisteina emerge anche dal fiorire di studi di associazione tra iperomocisteinemia e patologie diverse tra loro, oltre quelle su citate, quali le patologie neurodegenerative con particolare riferimento alla malattia di Alzheimer, l'insufficienza renale cronica, gli adenomi e i carcinomi colon-rettali, le malattie infiammatorie croniche intestinali.

L'omocisteina è un aminoacido solforato che si trova al punto di congiunzione di due diverse vie metaboliche. Essa può essere rimetilata in metionina mediante l'acquisizione di un gruppo metilico fornito dal 5-metiltetraidrofolato o dalla betaina. La reazione con il 5-metiltetraidrofolato è catalizzata dall'enzima metionina sintasi che richiede come coenzima la metil cobalamina, derivante dalla vitamina B12. Il gruppo metilico del 5-metiltetraidrofolato deriva dal trasferimento di un atomo di carbonio al tetraidrofolato per produrre metilene-tetraidrofolato, che viene successivamente ridotto a opera della metilene-tetraidrofolato-reduttasi (MTHF-R). La rimetilazione dell'omocisteina a metionina svolge un importante ruolo nella catena metabolica che regola la biosintesi dei nucleosidi.

L'omocisteina è implicata in una seconda via metabolica di trans-solforazione. L'omocisteina deriva dalla metionina, la quale viene attivata mediante ATP per formare S-Adenosilmetionina (SAM); questa, essendo un donatore di gruppi metilici, svolge un importante ruolo in molti processi di trans-metilazione, quali la metilazione del DNA, di proteine, di neurotrasmettitori e fosfolipidi. Il prodotto intermedio di tali reazioni di trans-metilazione è l'S-adenosilomocisteina (SAH) che viene poi idrolizzata per generare l'omocisteina la quale, nelle reazioni di trans-solforazione, si condensa con una molecola di serina e forma la cistationina, successivamente trasformata in cisteina. La reazione di condensazione tra l'omocisteina e la serina è catalizzata dalla cistationina beta-sintasi (CBS) che annovera tra i suoi cofattori il piridossal 5'-fosfato, il cui precursore è la vitamina B6. La via della trans-solforazione permette l'eliminazione dal plasma di omocisteina potenzialmente tossica, che non è richiesta dalla via della trans-metilazione.

Un aumento dell'omocisteina nel plasma (iperomocisteinemia) e nelle urine (omocistinuria) può essere determinato da una serie di disordini congeniti o acquisiti, che influenzano direttamente il metabolismo dell'omocisteina. Accanto al "classico" difetto congenito omozigote della CBS, che determina sul piano clinico l'omocistinuria e sul piano biochimico concentrazioni plasmatiche di omocisteina e metionina a digiuno molto elevate, vi sono altri difetti, meno comuni, causa di iperomocisteinemia. Difetti nella sintesi *de novo* della metionina possono determinare aumento di omocisteina plasmatica; in particolare, il deficit di MTHF-R può essere alla base di un'aumentata concentrazione plasmatica di omocisteina. Un modico aumento nel plasma di omocisteina si può verificare anche nei soggetti eterozigoti per tali difetti metabolici (CBS, MTHF-R). Anche disordini nutrizionali, quali deficit di vitamina B12, folati e vitamina B6 possono determinare una modica iperomocisteinemia.

La complessità della via metabolica in cui sono coinvolte omocisteina e metionina, l'elevato numero di cofattori interferenti con le singole reazioni enzimatiche e il perfetto equilibrio richiesto per il corretto funzionamento di tutto il ciclo metabolico fanno sì che diversi fattori siano responsabili di iperomocisteinemia, anche moderata.

In conclusione, le cause dell'iperomocisteinemia severa o moderata possono dividersi in due grossi gruppi: quelle di tipo congenito, causate da mutazione di geni codificanti per uno specifico enzima, e quelle acquisite, dovute a deficit nutrizionali della componente vitaminica.

Iperomocisteinemia moderata e difetti del tubo neurale

Nell'ambito delle malformazioni congenite si è sviluppato molto interesse sull'associazione tra iperomocisteinemia moderata e rischio di DTN.

I DTN includono un gruppo eterogeneo di malformazioni con caratteristiche anatomo-patologiche differenti secondo la fase dell'embriogenesi nella quale tali difetti si sviluppano. I DTN sono conseguenza di un'imperfetta differenziazione, fusione e chiusura delle strutture cranioencefaliche e del midollo spinale. I DTN più comuni sono l'anencefalia e la spina bifida (SB). L'anencefalia è una parziale agenesia della volta cranica con la persistenza di un piccolo residuo del cervello, conseguente a una incompleta chiusura della porzione rostrale del tubo neurale; questa è una condizione generalmente fatale prima o subito dopo la nascita. La SB risulta dall'alterata chiusura degli archi posteriori dei corpi vertebrali con la conseguente esposizione del midollo spinale e dei nervi. Questa condizione, nonostante sia causa di gravi alterazioni neurologiche, è compatibile con la vita. Studi epidemiologici hanno mostrato una estrema variabilità nell'incidenza naturale di tale gruppo di patologie. Essa risulta più elevata in alcune popolazioni del nord della Cina (6/1000) e nella popolazione messicana (3/1000), mentre è meno frequente nelle popolazioni Scandinave (1/5000); in Italia, l'incidenza naturale (calcolata prima della diffusione della diagnosi prenatale) è di circa 1/1000 (circa 550 casi totali l'anno).

I DTN vengono classificati come disordini multifattoriali, derivanti cioè dall'interazione di fattori genetici e fattori ambientali. L'osservazione che un'assunzione preconcezionale di acido folico (AF) possa fortemente ridurre (fino al 70%) il rischio di occorrenza e ricorrenza di DTN ha fatto nascere l'ipotesi che esista un'alterazione lungo le vie metaboliche nelle quali l'AF interviene. Sono state quindi analizzate alcune cause genetiche di iperomocisteinemia moderata quale fattore di rischio per l'insorgenza dei DTN; in particolar modo è stata studiata una mutazione del gene MTHF-R (C677T) (1, 2).

Il gene MTHF-R è localizzato sul cromosoma 1 (regione 1p36,3). La sequenza del cDNA è di 2,2 kilobasi e contiene 11 esoni. Il principale prodotto del gene MTHF-R nell'uomo è una proteina di 77 kDa, sebbene una isoforma più piccola di circa 70 kDa sia stata osservata in

alcuni tessuti. Una variante allelica di questo gene, comune in molte popolazioni, è caratterizzata da una mutazione puntiforme che trasforma una citosina in timina in posizione 677 del cDNA e che determina, a livello proteico, la sostituzione di una alanina con una valina in posizione 222. Questa deficienza ereditaria di MTHF-R, disordine autosomico recessivo, è il più comune errore congenito del metabolismo dell'AF e causa una maggiore termolabilità e una ridotta attività dell'enzima, che si traduce *in vivo* in una condizione di iperomocisteinemia moderata. I livelli di attività dell'enzima MTHF-R negli individui omozigoti per questa mutazione sono ridotti di circa il 60% rispetto agli omozigoti normali, mentre negli eterozigoti la riduzione è di circa il 35%. Tuttavia, una metanalisi di studi controllati in tutto il mondo ha dimostrato che la mutazione MTHF-R 677C->T potrebbe spiegare non più del 6% dei DTN folato-sensibili contro il 50-70% di riduzione del rischio osservato in seguito a somministrazione periconcezionale di AF (3). Per tale motivo, sono state studiate mutazioni di altri geni codificanti per enzimi implicati nel metabolismo dell'omocisteina e dei folati quali fattori di rischio aggiuntivi per DTN. Recentemente è stato identificato un nuovo polimorfismo del gene MTHF-R, la mutazione A1298C: la condizione di omozigosità per l'allele 1298C causa una riduzione dell'attività della MTHF-R, ma non sembra associata a un aumentato rischio di insorgenza di DTN. Tuttavia, tale polimorfismo, in eterozigosi con la mutazione C677T della MTHF-R, aumenta il rischio di sviluppo di DTN di 2,8 volte (4). Anche per il gene della metionina sintasi reduttasi (MTRR) è stata descritta una variante polimorfica, A66G, considerata un fattore di rischio aggiuntivo per DTN. Infatti, Wilson *et al.* hanno dimostrato che la condizione di omozigosi per questa mutazione incrementa il rischio di SB in presenza di bassi livelli plasmatici di cobalamina, fornendo la prima evidenza di associazione tra deficit di vitamina B12 e DTN (5). Infine, è stata studiata in modo particolare una variante polimorfica comune del gene CBS. Essa è rappresentata da una inserzione derivante da una duplicazione in tandem del confine tra esone e introne all'estremità 5' dell'esone 8 (844ins68) che segrega *in cis* con un'altra mutazione della CBS (T833C). Questa duplicazione genera due accettori per uno splicing alternativo, consentendo la produzione di due isoforme: un mRNA contenente l'inserzione di 68 paia di basi, che provoca la terminazione prematura del processo di traduzione, e un mRNA che, utilizzando il secondo accettore, è il solo che è trasportato nel citoplasma e che non contiene la mutazione T833C (6).

Sono attualmente disponibili solo dati limitati sulla potenziale interazione tra differenti alleli di geni coinvolti nel metabolismo dei folati.

Nel 1997 in uno studio irlandese, Ramsbottom *et al.* hanno analizzato l'effetto dell'interazione tra il genotipo omozigote per la mutazione MTHF-R C677T e l'allele 844ins68 della CBS, escludendo la presenza di un rischio aumentato di DTN per la combinazione dei due genotipi (7). Successivamente, una rivalutazione statistica dei dati forniti dallo studio irlandese ha indicato che la presenza di entrambi i genotipi era associata a un aumento del rischio di SB di 5 volte rispetto al genotipo "wild type" (8). In un ampio studio italiano caso-controllo, nato dalla collaborazione tra il Dipartimento di Pediatria dell'Università "Federico II" di Napoli, il Dipartimento di Pediatria dell'Università Cattolica di Roma e l'Istituto "G. Gaslini" di Genova, sono stati valutati gli effetti dell'associazione del genotipo MTHF-R 677TT e della mutazione CBS844ins68 allo stato eterozigote sul rischio di SB, analizzati singolarmente o in maniera combinata. L'elaborazione statistica dei risultati ottenuti ha mostrato che l'omozigosi per l'allele MTHF-R 677C->T aumenta il rischio di SB di 1,57 volte (95% CI, 1,02-2,38) mentre la sola presenza dell'allele 844ins68 della CBS non costituisce un fattore di rischio per DTN (OR 0,83; 95% CI, 0,39-1,64); tuttavia, l'associazione dei due genotipi aumenta il rischio di DTN di 3,69 volte (9, 10). Tale risultato è particolarmente interessante in quanto indica la presenza di una interazione tra i due alleli: infatti, la combinazione dei genotipi è associata a un rischio che eccede quello atteso dalla analisi dei due alleli considerati singolarmente.

Da tale studio emerge anche un dato contrastante e di particolare interesse: nonostante l'alta frequenza della mutazione C677T in Italia (16,6% contro 13% in Spagna, 12% in Francia, 11,1% in Ungheria, 5,2% in Canada, 8,5% in Australia, 4% in Finlandia e 7% in Russia) non si osserva una maggiore incidenza di DTN. Questo paradosso può trovare spiegazione nel ruolo protettivo di altri fattori sia genetici, tutt'ora da identificare, che ambientali tra i quali la dieta mediterranea particolarmente ricca di frutta e verdure e, quindi, di folati.

Studi di interazione tra genotipi e fattori ambientali sono necessari per la piena comprensione di tale patologia a carattere multifattoriale.

Metabolismo dell'omocisteina e dei folati e altre malformazioni congenite

Studi sperimentali ed epidemiologici hanno dimostrato che il deficit di AF o una condizione di iperomocisteinemia moderata sono associati a difetti cardiaci, in particolare difetti conotruncali. In uno studio sperimentale su modelli animali, la somministrazione di omocisteina ha causato difetti del setto interventricolare nel 23% degli embrioni sopravvissuti; nello stesso studio la supplementazione con AF, riducendo i livelli di omocisteina plasmatica, aveva un effetto preventivo sul danno malformativo, dimostrando un ruolo causale dell'omocisteina nella dismorfogenesi cardiaca (11). Inoltre, studi epidemiologici condotti nella popolazione ungherese e americana hanno evidenziato una riduzione del rischio di difetti congeniti cardiaci mediante supplementazione con AF (12-14).

L'associazione tra palatoschisi (PS), isolata o accompagnata da labioschisi (LS), e deficit di AF è nota da tempo. Già nel 1952 Tierch *et al.* (15) notarono un'aumentata incidenza di LPS in nati da madri in trattamento con farmaci antagonisti dell'AF. Successivamente, Munger e Romitti (16, 17) rilevarono la forte associazione tra LPS e alcolismo materno, una causa oggi nota di iperomocisteinemia. Infine, in studi su popolazioni, è emerso che l'assunzione preconcezionale di AF riduce il rischio di tale malformazione (18). L'analisi dell'associazione tra la variante termolabile dell'enzima MTHF-R (C677T/T) e LPS ha fornito invece risultati contraddittori.

Infine, recenti evidenze indicano una riduzione del rischio di difetti trasversi degli arti nel nascituro in seguito a supplementazione materna con complessi multivitaminici contenenti AF in epoca periconcezionale (19).

Studi preliminari individuano nello stress ossidativo e nella disfunzione vascolare, associati ad aumentati livelli di omocisteina, il principale momento patogenetico del danno malformativo. Infatti, l'omocisteina subisce *in vivo* un processo di auto-ossidazione con formazione di radicali liberi dell'ossigeno, perossidazione lipidica e lipoproteica e danno endoteliale. Inoltre, l'iperomocisteinemia per se può condizionare, a livello vascolare, un fenotipo protrombotico (20). Tuttavia, ulteriori studi sperimentali ed epidemiologici sono necessari per chiarire l'effettivo ruolo dei deficit vitaminici e/o dell'iperomocisteinemia nella genesi di tali malformazioni congenite.

Iperomocisteinemia moderata e sindrome di Down

Recenti evidenze indicano l'esistenza di una associazione tra sindrome di Down e polimorfismi genetici degli enzimi coinvolti nel metabolismo dei folati.

La sindrome di Down è un disordine genetico complesso derivante dalla presenza di tre copie del cromosoma 21 dovuta, nel 95% dei casi, a una non disgiunzione di origine materna nel corso della meiosi. Sebbene sia noto che l'età materna avanzata sia il principale fattore di

rischio per la trisomia del 21, una percentuale significativa di bambini con sindrome di Down nascono da madri di età inferiore ai 30 anni. Sulla base di questa osservazione e di precedenti studi, dove l'ipometilazione del DNA genomico è risultata associata a instabilità cromosomica e a segregazione anomala, James *et al.* (21) hanno analizzato lo stato dei folati, la concentrazione di omocisteina plasmatica e la frequenza del polimorfismo MTHF-R 677C->T nelle madri di bambini con sindrome di Down. È noto infatti, come sopra accennato, che l'enzima MTHF-R svolge un ruolo centrale nella regolazione delle reazioni di metilazione condizionando la sintesi di SAM, il maggior donatore intracellulare di metili. Tale studio ha mostrato un significativo aumento delle concentrazioni plasmatiche di omocisteina e una maggiore frequenza dell'allele mutato MTHF-R 677C->T nelle madri di bambini con sindrome di Down rispetto ai controlli. Studi successivi hanno analizzato la presenza di polimorfismi materni di un secondo gene coinvolto nel metabolismo dei folati, la metionina sintasi reduttasi (MTRR 66A->G), dimostrando un'augmentata frequenza del genotipo GG nelle madri e un rischio aumentato di sindrome di Down quando i genotipi CT o TT della MTHF-R e il genotipo GG della MTRR venivano osservati nella stessa donna (22, 23). Dati contrastanti emergono da un recente studio in cui è stata analizzata l'associazione tra i polimorfismi 677C->T della MTHF-R o 66A->G della MTRR e trisomie di eterocromosomi o autosomi diversi dal cromosoma 21 (trisomie dei cromosomi 2, 7, 10, 13, 16, 18 e 22) al fine di indagare l'effetto di alterazioni del metabolismo dei folati sulla non-disgiunzione meiotica (24). I risultati ottenuti indicano un'augmentata frequenza del polimorfismo MTHF-R solo nelle madri dei bambini con trisomia del cromosoma 18, fornendo complessivamente uno scarso supporto all'ipotesi di un effetto determinante di polimorfismi materni del pathway dei folati nella non-disgiunzione cromosomica. Il dato isolato di associazione con la trisomia 18 potrebbe infatti riflettere un ruolo preferenziale del polimorfismo MTHF-R nella non-disgiunzione del cromosoma 18 o rappresentare un'osservazione fortuita derivante dalla piccola quantità di casi studiati.

Le cause della discrepanza dei risultati di questo studio rispetto a quelli relativi alla trisomia del 21 non sono state ancora chiarite e potrebbero risiedere in differenze nello stato nutrizionale delle popolazioni analizzate o in un effetto causale di tali polimorfismi ristretto preferenzialmente ad alcuni cromosomi.

È presumibile che non solo l'interazione tra dieta e genotipo, ma anche l'interazione tra ambiente e genotipi differenti, ancora da identificare, siano necessarie per l'estrinsecarsi di tali patologie a carattere malformativo.

Bibliografia

- 1) van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Mariman EC, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346(8982):1070-1.
- 2) De Franchis R, Sebastio G, Mandato C, Andria G, Mastroiacovo P. Spina bifida, 677T->C mutation, and role of folate. *Lancet* 1995;346(8991-8992):1703.
- 3) Botto LD, Mulinare J, Erickson JD. Occurrence of congenital heart defects in relation to maternal multivitamin use. *Am J Epidemiol* 2000;151(9):878-84.
- 4) Trembath D, Sherbondy AL, Vandyke DC, Shaw GM, Todoroff K, Lammer EJ, Finnell RH, Marker S, Lerner G, Murray JC. Analysis of select folate pathway genes, PAX3, and human T in a Midwestern neural tube defect population. *Teratology* 1999;59(5):331-41.
- 5) Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA, Rozen R. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 1999;67(4):317-23.

- 6) Sebastio G, Sperandeo MP, Panico M, de Franchis R, Kraus JP, Andria G. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. *Am J Hum Genet* 1995;56(6):1324-33.
- 7) Ramsbottom D, Scott JM, Molloy A, Weir DG, Kirke PN, Mills JL, Gallagher PM, Whitehead AS. Are common mutations of cystathionine beta-synthase involved in the aetiology of neural tube defects? *Clin Genet* 1997;51(1):39-42.
- 8) Botto LD, Mastroiacovo P. Exploring gene-gene interactions in the etiology of neural tube defects. *Clin Genet* 1998;53(6):456-9.
- 9) de Franchis R, Buoninconti A, Mandato C, Pepe A, Sperandeo MP, Del Gado R, Capra V, Salvaggio E, Andria G, Mastroiacovo P. The C677T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. *J Med Genet* 1998; 35(12):1009-13.
- 10) De Franchis R, Mandato C, Buoninconti A, Sperandeo MP, Capra V, De Marco P, Ricci R, Mastroiacovo P, Salvaggio E, Sebastio G, Andria G. Risk factors for neural tube defects: analysis of common genetic variants of methylenetetrahydrofolate reductase and cystathionine beta-synthase. *Am J Hum Genet* 1997;61:151.
- 11) Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. Related Articles, OMIM, Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(26):15227-32.
- 12) Czeizel AE, Toth M, Rockenbauer M. Population-based case control study of folic acid supplementation during pregnancy. *Teratology* 1996;53(6):345-51.
- 13) Shaw GM, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ. Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *Am J Med Genet* 1995;59(4):536-45.
- 14) Scanlon KS, Ferencz C, Loffredo CA, Wilson PD, Correa-Villasenor A, Khoury MJ, Willett WC. Preconceptional folate intake and malformations of the cardiac outflow tract. Baltimore-Washington Infant Study Group. *Epidemiology* 1998;9(1):95-8.
- 15) Thiersch JB. Therapeutic abortions with a folic acid antagonist 4-aminopteroxyglutamic acid administered by the oral route. *Am J Obstet Gynecol* 1952; 63: 1298-304.
- 16) Munger RG, Romitti PA, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC, Hanson J. Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology* 1996;54(1):27-33.
- 17) Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology* 1999;59(1):39-50.
- 18) Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, O'Malley CD, Tolarova MM. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet* 1995;346(8972):393-6.
- 19) Yang Q, Khoury MJ, Olney RS, Mulinare J. Does periconceptional multivitamin use reduce the risk for limb deficiency in offspring? *Epidemiology* 1997;8(2):157-61.
- 20) Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996;98(1):5-7.
- 21) James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL, Gaylor DW. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70(4):495-501.

- 22) Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R, James SJ. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000;67(3):623-30.
- 23) O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, Scott JM, Mills JL. MTRR and MTHF-R polymorphism: link to Down syndrome? *Am J Med Genet* 2002;107(2):151-5.
- 24) Hassold TJ, Burrage LC, Chan ER, Judis LM, Schwartz S, James SJ, Jacobs PA, Thomas NS. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. *Am J Hum Genet* 2001;(2):434-9.

LE MALATTIE RARE E LE MALFORMAZIONI CONGENITE: STRATEGIE IN SANITÀ PUBBLICA. INIZIATIVE DEL CENTRO NAZIONALE MALATTIE RARE

Domenica Taruscio, Antonella Allegritti, Paolo Salerno, Moges Seyoum Ido
Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le malattie rare e le strategie in sanità pubblica

Le malattie rare (MR) sono caratterizzate da un bassa occorrenza nella popolazione. Tuttavia, attualmente, non esiste una definizione universalmente accettata. I Paesi che fino a oggi hanno svolto azioni di politica sanitaria in questo ambito hanno adottato definizioni che presentano sostanziali differenze. Nella Comunità Europea sono considerate rare le malattie che hanno una prevalenza non superiore a 5 su 10000 abitanti (1), mentre il Congresso degli Stati Uniti ha fissato la soglia di 200000 casi nella popolazione totale (2).

In ogni caso, a prescindere dal limite individuato nei diversi Paesi, le MR, pur rappresentando un gruppo eterogeneo di patologie, sono state aggregate in ragione della necessità di realizzare un approccio comune in sanità pubblica, mirante alla risoluzione di una serie di problemi.

Le MR sono caratterizzate da numerosità ed eterogeneità.

Infatti nel loro insieme sono circa 5000 e rappresentano circa il 10% delle patologie umane conosciute interessando quindi una frazione rilevante della popolazione.

Le MR si presentano eterogenee nell'eziopatogenesi, nell'efficacia delle attività di prevenzione, nelle possibilità offerte dalle varie opzioni terapeutiche e quindi nella probabilità di progressione verso sequele cronico-invalidanti. La presenza trasversale delle MR in tutti i gruppi nosologici dell'International Classification of Diseases (ICD) IX CM ribadisce questo elemento.

La numerosità e l'eterogeneità, associate all'elemento che le caratterizza, ossia la rarità, sono i fattori all'origine delle difficoltà sia nella realizzazione di programmi di sanità pubblica che nello svolgimento dell'attività epidemiologica.

Gli obiettivi in sanità pubblica possono essere schematizzati come segue:

- 1) garantire a tutti i cittadini una diagnosi appropriata e tempestiva che nella realtà attuale è ostacolata da percorsi diagnostici tortuosi, che esitano in lunghi tempi di latenza tra esordio della patologia e diagnosi e che spesso si riflettono negativamente sulla prognosi del paziente;
- 2) diffondere le conoscenze scientifiche disponibili attraverso la condivisione delle esperienze cliniche maturate dagli operatori sanitari;
- 3) sostenere l'attività di ricerca sia essa di base che orientata alla clinica.

Gli obiettivi dell'attività epidemiologica sono rappresentati dalla realizzazione di uno strumento, rappresentato dal Registro Nazionale Malattie Rare, in grado di:

- 1) definire la dimensione del problema rappresentato dalle MR (incidenza e/o prevalenza);
- 2) fornire indicazioni sulle misure di sanità pubblica da adottare per rispondere adeguatamente ai bisogni di salute dei pazienti affetti da MR;
- 3) valutare l'efficacia degli interventi realizzati e ridefinire gli obiettivi.

Su entrambi questi versanti un approccio ragionevole è rappresentato dall'individuazione di gruppi di patologie su cui operare selettivamente. Infatti la risposta normativa ai problemi connessi alle MR prevede l'individuazione di strutture sanitarie sul territorio nazionale istituzionalmente deputate a occuparsi delle MR o gruppi di queste (3).

Anche l'attività del Centro Nazionale Malattie Rare (CNMR), nell'ambito del Registro Nazionale MR, si è orientata verso la definizione di gruppi di malattie per poter affrontare con successo i problemi legati alla raccolta di dati su un numero così cospicuo di malattie tanto diverse tra loro.

Individuata la necessità di costituire gruppi di patologie, abbiamo ritenuto di orientare la nostra attenzione sulle Malformazioni Congenite (MC) e di contribuire a definire l'efficienza di alcuni modelli di prevenzione con particolare riguardo al rapporto tra folati e difetti del tubo neurale (DTN), labiopalatoschisi (LPS) e difetti cardiovascolari.

Le malformazioni congenite e le strategie in sanità pubblica

Le MC sono difetti riguardanti la forma, la posizione, la struttura di un organo o parte di esso o di una più ampia sezione corporea.

Questi difetti si sviluppano in epoca pre-natale, ma possono rivelarsi sia alla nascita che più tardivamente.

L'interesse su queste patologie deriva da svariati motivi:

- 1) Attualmente le MC, nel nostro Paese, colpiscono il 5-6% di tutti i nati e quindi il fenomeno presenta una notevole consistenza numerica. Come si evince dal Rapporto "WHO/EURO Meeting on Development of EURO Strategy on Congenital Disorders Minsk, November 29-30, 2001" i difetti congeniti nei Paesi europei contribuiscono in modo rilevante al totale della mortalità infantile (4). Ridurre la mortalità infantile a un tasso minore di 10/1000 risulta molto difficile al di fuori di strategie preventive indirizzate ai difetti congeniti, che contribuiscono almeno per il 20% alla mortalità infantile nella maggior parte dei Paesi europei.
- 2) L'impatto sul sistema sanitario è notevole. Circa un terzo delle ospedalizzazioni in età pediatrica sono da imputare alle MC e molto spesso la diagnosi, il trattamento e la riabilitazione richiedono tempi lunghi e l'impiego di cospicue risorse. Inoltre queste patologie hanno spesso esiti invalidanti che deteriorano la qualità della vita dei pazienti (sono responsabili di circa un terzo dei ritardi mentali).
- 3) Le MC rappresentano un importante indicatore per le attività di sorveglianza ambientale. Infatti, le cause o i fattori di rischio svolgono la loro azione con un tempo di latenza molto breve. Questa caratteristica permette in molti casi di ipotizzare e quantificare le cause ed i fattori di rischio con maggiore facilità rispetto ad altre patologie (ad esempio, i tumori). Inoltre, il limitato intervallo di tempo necessario alle *noxae* malformative per determinare la malattia può consentire interventi di rimozione del rischio e prevenire quindi nuove esposizioni su soggetti sani, ultima finalità dell'attività di sorveglianza.
- 4) La ricerca eziopatogenetica in molti casi non ha fornito indicazioni di rilievo. Infatti a fronte del 25% del totale di queste patologie che possono essere fatte risalire a cause genetiche e di percentuali oscillanti tra il 6 e il 9% da imputare a cause ambientali, la maggior parte di queste malattie rimane a eziopatogenesi sconosciuta.

Tutto ciò individua nelle MC un'area di grande importanza nelle azioni di sanità pubblica. Le dimensioni del problema, il peso sociale, il costo delle risorse necessarie alla diagnosi e al trattamento e la possibilità di mettere in atto strategie di prevenzione efficaci indurrebbe a uno sforzo in questo ambito.

Inoltre, un altro elemento importante che individua in questo settore un'area prioritaria è rappresentato dalla presenza di alcuni registri regionali, che da anni svolgono la loro attività fornendo informazioni molto utili sul fenomeno.

Registri regionali delle malformazioni congenite

Nel nostro Paese sono presenti vari Registri delle MC, attivi a livello regionale. Si fa qui riferimento al Registro Toscana (Registro Difetti Congeniti Toscana), al Registro Emilia Romagna (IMER, Indagine Malformazioni Emilia Romagna), al Registro del Nord-Est Italia (NEI), al Registro Sicilia (ISMAL, Indagine Siciliana Malformazioni Congenite), al Registro Campania (RCDC, Registro Campania Difetti Congeniti) e al Registro Lombardia.

Il Registro Toscana svolge la sua attività dal 1979; dal 1992 ha esteso l'oggetto dell'indagine alle interruzioni volontarie di gravidanza (IVG), oltre ai nati e ai casi diagnosticati entro il primo anno di vita. Ha una copertura di oltre il 95% delle circa 26000 nascite che attualmente avvengono nella Regione Toscana. Il Registro Emilia Romagna inizia la sua attività nel 1978. Dal 1996 sono oggetto di indagine anche le interruzioni di gravidanza a seguito di diagnosi prenatale di malformazione. La copertura è di circa il 95% di tutti i nati che sono circa 26.000 l'anno. Il Registro Nord-Est Italia inizia la sua attività nel Veneto nel 1981, che successivamente viene estesa nel 1983 all'ospedale di Bolzano e alla Regione Friuli-Venezia Giulia e, dal 1989, a tutto l'Alto Adige. L'indagine prevede la registrazione di tutti i difetti congeniti in periodo prenatale, alla nascita e nella prima settimana di vita. La copertura totale delle nascite è di circa il 95% che ammonta a circa 57000 nati/l'anno. Il Registro Sicilia inizia la sua attività nel 1991. Sorveglia attualmente circa 20000 nascite/l'anno nella Sicilia orientale. Dal 1999 il protocollo di indagine di questo registro prevede la registrazione dei difetti congeniti rilevati nelle IVG. Il Registro Campania inizia la sua attività nel 1991 e rileva circa 50000 nascite/l'anno con una copertura che si aggira intorno al 75%. Il protocollo di indagine prevede la registrazione dei difetti congeniti in periodo prenatale (IVG), alla nascita e nella prima settimana di vita. Il Registro Lombardia è un registro su base ospedaliera e rileva circa 30000 nascite l'anno. L'attività di questi registri, a eccezione del Registro Lombardia, è collegata, a livello europeo, nella confluenza nello European Registration of Congenital Anomalies and Twins (EUROCAT) e, a livello mondiale, nell'International Clearinghouse for Birth Defect Monitoring Systems (ICBDMS).

Quindi, risulta naturale e opportuna la collaborazione tra queste strutture epidemiologiche che operano a livello regionale e il Registro Nazionale Malattie Rare nell'attività di sorveglianza e prevenzione delle MC.

Dal Rapporto WHO/EURO sopracitato scaturiscono alcune indicazioni sugli approcci più rilevanti per la prevenzione dei disordini congeniti, che includono diverse attività:

- 1) igiene ambientale al fine di evitare la comparsa di nuove mutazioni;
- 2) educazione sanitaria e pianificazione familiare al fine di scoraggiare la gravidanza in età avanzata;
- 3) supplementazione periconcezionale o fortificazione degli alimenti con acido folico (AF);
- 4) vaccinazione contro la rosolia;
- 5) lotta contro il consumo di alcool e il fumo durante la gravidanza;
- 6) promozione e realizzazione di screening prenatali e preconcezionali.

Iniziative del Centro Nazionale Malattie Rare sui folati e malformazioni congenite

Nell'ambito delle attività del CNMR sulle MC, hanno particolare rilievo le attività relative al ruolo dei folati nella prevenzione delle MC; queste sono realizzate nell'ambito del Progetto "Registro Nazionale Malattie Rare" finanziato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) (art. 502/99) in collaborazione con il coordinamento dei Registri italiani delle MC (Responsabile: F. Bianchi), l'International Center for Birth Defects Monitoring and Surveillance (Responsabile: P. Mastroiacovo) e con il Centers for Disease Control-USA (L. Botto). Tali attività comprendono:

- 1) valutazione attraverso la metanalisi dei dati di letteratura del ruolo di polimorfismi di geni coinvolti nel metabolismo dei folati nella patogenesi di MC, con particolare attenzione ai DTN, ma anche a LPS, difetti della parete addominale, difetti cardiovascolari. Oltre alla identificazione delle possibili associazioni, l'obiettivo è anche quello di valutare il rischio attribuibile in termini sia individuali che di popolazione;
- 2) indagine pilota in collaborazione con la Regione Toscana per valutare il livello di informazione nelle donne in gravidanza sul ruolo preventivo dell'assunzione dell'AF. L'obiettivo sarà l'elaborazione di migliori strategie di informazione rivolta sia alle donne che agli operatori sanitari;
- 3) nell'ambito delle attività di formazione organizzate dal CNMR, sono stati organizzati due workshop, il primo a carattere interdisciplinare intitolato "Interazione geni-ambiente: folati e MC" (ISS, 7 dicembre 2001) di cui il presente *Rapporto ISTISAN* raccoglie i risultati e il successivo workshop "Acido folico e prevenzione in Toscana: un modello di approccio integrato per trasferire i risultati della ricerca nella pratica clinica" (Firenze, Regione Toscana, 10 aprile 2002).

L'attività del CNMR (<http://www.malattierare.iss.it>) coinvolge diversi ambiti e in particolare:

- 1) realizzazione del Registro Nazionale MR;
- 2) attività di ricerca;
- 3) standardizzazione e assicurazione di qualità dei test genetici;
- 4) attività connesse con i farmaci orfani;
- 5) formazione degli operatori sanitari, miglioramento dei rapporti fra le istituzioni, i cittadini e le associazioni dei pazienti e dei familiari;
- 6) collegamenti nazionali: istituti di ricovero e cura a carattere scientifico, università, altri istituti di ricerca, ospedali, ecc.; e internazionali: Network of Public Health Institutions on Rare Diseases (NEPHIRD), Centers for Disease Control and Prevention (CDC), European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), Committee for Orphan Medicinal Products (COMP) e Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

Di seguito descriveremo brevemente le attività più strettamente attinenti alla prevenzione, sorveglianza e ricerca sulle MC.

Registro Nazionale Malattie Rare

L'istituzione presso l'ISS del Registro Nazionale Malattie Rare (DM del 24 aprile 2000, *GU* n. 131 del 7 giugno 2000 e DM 18 maggio 2001, n. 279, *GU* n. 160, del 12 luglio 2001 Suppl. Ord. n. 180/L) ha lo scopo di ottenere informazioni epidemiologiche utili a definire le dimensioni del problema.

Il Registro si propone quale strumento per definire la prevalenza/incidenza delle MR, oltre ad acquisire informazioni relativamente alle risorse impiegate nella diagnosi, i tempi di latenza tra esordio della sintomatologia e diagnosi, l'utilizzazione dei criteri diagnostici nella definizione di caso.

Attualmente il Registro Nazionale MR è attivo, e sta raccogliendo dati da strutture sanitarie che operano su tutto il territorio nazionale; i dati preliminari sono disponibili sul sito <http://www.malattierare.iss.it>

Attività di ricerca

L'incremento delle conoscenze scientifiche è indispensabile per rendere più efficaci gli interventi sanitari. In modo particolare l'ambito delle MR soffre di carenze conoscitive dovute alla rarità stessa, alla numerosità, alla diversificazione e in generale allo scarso impegno profuso fino a oggi per chiarire meccanismi eziopatogenetici e sviluppare opzioni terapeutiche.

L'approccio scientifico alle MR necessita di un'interazione fra metodologie, culture e linguaggi degli ambiti genetico, clinico, farmacologico, epidemiologico, ecc. La diversità delle specializzazioni coinvolte e la numerosità dei centri con specifiche competenze richiedono sforzi coordinati per affrontare le grandi questioni relative alle MR.

Attualmente, l'attività dell'ISS è volta a studi sperimentali sia su meccanismi di regolazione genica nell'uomo (ad esempio, geni hPER1 e SYB2+) (5), sia su analisi di alterazioni genetiche in tumori rari (ad esempio, mesoteliomi, tumori del pancreas, linfomi maligni) (6). Sono in fase di avvio ulteriori studi su altre patologie rare selezionate, quali narcolessia, sindrome di Rett, sindrome di Moebius, sindrome di Ondine. Ciò verrà realizzato in collaborazione con centri di eccellenza nazionali e internazionali impegnati nei vari settori.

La formazione degli operatori sanitari e i rapporti con i cittadini e le associazioni

Il CNMR è impegnato in attività di formazione degli operatori sanitari attraverso la realizzazione di corsi, convegni, congressi e workshop.

L'impegno tende a raggiungere il duplice scopo di sensibilizzare gli operatori sanitari alle problematiche proprie delle MR (difficoltà diagnostica e quindi necessità di condividere le scelte diagnostiche e terapeutiche con altri colleghi) e di promuovere il confronto su specifiche patologie allo scopo di diffondere i progressi in ambito medico.

Infine, il centro svolge attività di studio e documentazione finalizzata a rispondere ai quesiti dei cittadini.

L'impegno a fornire un'informazione chiara ed esaustiva è reso complesso dalla difficile reperibilità delle informazioni stesse.

Nel sito web del CNMR è presente uno spazio specifico dove è possibile consultare un elenco delle associazioni dei pazienti e dei familiari con relativo indirizzo, recapito telefonico e indirizzo di posta elettronica, suddiviso per regione.

Network of Public Health Institutions on Rare Diseases (NEPHIRD)

Nel 1999 la Comunità Europea ha emanato la Decisione n. 1295/1999 in linea con il programma d'azione comunitaria sulle MR nel settore della sanità pubblica (1999-2003).

Monitoraggio, sorveglianza, allarme tempestivo per cluster rappresentano alcuni degli obiettivi individuati dalla Commissione.

Il Progetto NEPHIRD, coordinato dall'ISS (Responsabile scientifico: D. Taruscio) e finanziato dalla Commissione Europea ha lo scopo principale di realizzare modelli per la raccolta di dati epidemiologici sulle MR, mediante il confronto di esperienze e iniziative tra le istituzioni di sanità pubblica dei Paesi partecipanti. NEPHIRD rappresenta un network a cui collaborano 15 Paesi europei.

Questo progetto ha previsto la somministrazione di un questionario allo scopo di individuare le misure di politica sanitaria intraprese nei vari Paesi partecipanti e valutare le condizioni per realizzare un sistema per la raccolta di dati epidemiologici.

I risultati dimostrano che le situazioni sono molte diverse da un Paese all'altro. In Italia, Francia, e Danimarca sono state istituite strutture dedicate alle MR, mentre in molti altri Paesi si sono sviluppate varie iniziative volte ai problemi connessi alle MR.

Un approccio ragionevole sarà quindi quello di valorizzare le diverse iniziative intraprese nei diversi Paesi per poter successivamente meglio definire alcuni aspetti metodologici.

Le attività di NEPHIRD in corso prevedono di sviluppare l'armonizzazione degli approcci alla sorveglianza delle MR utilizzando come modelli un numero limitato di patologie: tra queste le MC sono rappresentate dai difetti di riduzione degli arti, dalla sindrome di Cornelia de Lange e dalla sindrome di Prader-Willi.

Nell'ambito del portale web dedicato alle MR, un sito è dedicato al progetto europeo NEPHIRD (<http://www.cnmr.iss.it/Nephird/index.htm>). Questo spazio potrà essere utile per diffondere le informazioni raccolte e facilitare la collaborazione internazionale, tra gli operatori di sanità pubblica, associazioni di pazienti e organizzazioni non profit.

Conclusioni

Le diverse attività del CNMR (7) condividono gli stessi obiettivi: lo sviluppo e la diffusione delle conoscenze scientifiche sulle MR e il miglioramento della qualità della vita dei pazienti affetti.

Il raggiungimento di questi obiettivi è subordinato a interventi che propongano un approccio che tenga conto dei problemi connessi alle MR.

La numerosità e l'eterogeneità di queste impongono la definizione di gruppi di patologie su cui volgere di volta in volta l'attenzione.

Le MC rappresentano un gruppo di grande interesse sia per i vantaggi che potrebbero derivare dall'attività di prevenzione, che per la possibilità di interazione tra strutture che sono già da molto tempo attive sul territorio.

In quest'ottica va interpretato il nostro impegno nello svolgimento di studi orientati a definire la prevalenza di MC rare e il ruolo della carenza e/o di difetti del metabolismo dei folati nella patogenesi delle malformazioni congenite.

Bibliografia

- 1) European Commission. Regulation (EC) n. 141/2000 of the European Parliament and of the Council of 16 December on orphan medicinal products. *Official Journal* L.018, 22 January 2000; 1-5.
- 2) The Orphan Drug Act. *Public Law* 97-414. Washington (DC): January 4, 1983.
- 3) Italia. Decreto ministeriale maggio 2001, n. 279. Regolamento di istituzione della rete nazionale delle malattie rare e di esenzione dalla partecipazione al costo delle relative prestazioni sanitarie. *Gazzetta Ufficiale* n. 160, del 12 luglio 2001. Supplemento ordinario n. 180/L.

- 4) Report of “WHO/EURO Meeting on Development of EURO Strategy on Congenital Disorders Minsk, November, 29-30 2001”.
- 5) Taruscio D, Zoraqi GK, Falchi M, Iosi F, Paradisi S, Di Fiore B, Lavia P, Falbo V. The human perl gene: genomic organization and promoter analysis of the first human orthologue of the Drosophila period gene. *Gene* 2000; 8;253(2):161-70.
- 6) Taruscio D, Paradisi S, Zamboni G, Rigaud G, Falconi M, Scarpa A. Pancreatic acinar carcinoma shows a distinct pattern of chromosomal imbalances by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28(3):294-9.
- 7) Taruscio D, Allegritti A, D’Agnolo G, D’Ippolito C, Falbo V, Florida G, Greco D, Grilli G, Mancino N, Marongiu C, Niglio T, Patriarca V, Pescucci C, Salerno P, Seyoum Ido M, Salvatore M, Stazi MA, Tosto F. Centro Nazionale Malattie Rare. *Notiziario Ist Super Sanità* 2001;14(7/8):3-10.

CONCLUSIONI

Alberto Mantovani (a), Anna Velia Stazi (a), Domenica Taruscio (b)

(a) *Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

In questo rapporto con il termine generico di folati si sono voluti indicare tutti quei composti ad attività vitaminica correlati con l'acido folico (AF). La carenza e/o le alterazioni del metabolismo dei folati sono eventi multifattoriali complessi che sono stati valutati dal punto di vista nutrizionale, tossicologico, clinico-patologico e genetico. In particolare, un adeguato apporto di acido folico, la forma più ossidata e stabile dei folati, è certamente un importante fattore di prevenzione per il rischio di esiti avversi in gravidanza e di malformazioni congenite nella prole. L'AF come già rilevato essendo contenuto sia in vari alimenti che in preparati multivitaminici, oltre a essere prodotto dalla flora intestinale, risulta come sia difficilmente riscontrabile una insufficienza primaria di acido folico; per contro, una sua possibile carenza può dipendere da condizioni patologiche del soggetto e/o da condizioni ambientali.

Studi multidisciplinari hanno indicato il ruolo protettivo dell'AF per le malformazioni congenite tra cui principalmente i difetti del tubo neurale (DTN) e le labiopalatoschisi (LPS). Tale vitamina contribuisce a controllare la produzione endogena di omocisteina; grande interesse stanno riscuotendo alcuni polimorfismi di enzimi associati al metabolismo dei folati (ad esempio, metiltetraidrofolato-reduttasi) come fattori di suscettibilità individuale, soprattutto riguardo ai DTN. È importante sottolineare che l'iperomocisteinemia moderata è causata sia da mutazioni di geni codificanti per uno specifico enzima del metabolismo dell'omocisteina che da disturbi dell'equilibrio vitaminico. Recenti ricerche hanno inoltre evidenziato una associazione tra sindrome di Down e polimorfismi genetici degli enzimi coinvolti nel metabolismo dei folati.

Accanto alla suscettibilità genetica, occorre dare una giusta attenzione ad altri fattori come gli stati patologici della donna in età fertile o le sostanze esogene che possono interferire con i folati. Tra i primi merita rilevanza la malattia celiaca che determina problemi di malassorbimento generale o carenze di fattori essenziali come ferro, zinco, AF e vitamine B12 e B6; queste carenze possono interferire oltre che con l'organogenesi, con i sistemi endocrino e immunitario e, pertanto, ripercuotersi sulla salute riproduttiva. Tra le sostanze esogene vanno considerati i farmaci come alcuni antiproliferativi, antiepilettici e antinfiammatori non steroidei. Anche sostanze presenti nell'ambiente di vita come il fumo di sigarette e alcool e alcuni contaminanti, come i composti metallici, possono interagire con i folati. Questi xenobiotici, avendo differenti meccanismi d'azione, possono interferire con diverse fasi del metabolismo dei folati; inoltre, alterazioni specifiche del metabolismo dei folati possono influenzare in modo differenziato la suscettibilità a determinati xenobiotici. Tuttavia, occorrono ulteriori informazioni sulle interazioni fra folati e contaminanti alimentari ed ambientali.

Occorre pertanto considerare l'utilità di una integrazione di AF per la donna in età fertile; infatti, per ridurre efficacemente il rischio di malformazioni congenite nella prole è importante che l'integrazione inizi prima del concepimento. Una campagna di comunicazione del rischio da parte dei medici di base, anche con il contributo dei media, potrebbe essere mirata soprattutto alle donne potenzialmente più vulnerabili, ad esempio, per condizioni dismetaboliche od uso di farmaci.

Da quanto detto, risulta chiara la necessità di una migliore e più diffusa conoscenza del ruolo dell'AF per il buon esito della gravidanza. Per programmare e coordinare attività di prevenzione, presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) è stato attivato e finanziato (art. 502/99)

il Centro Nazionale delle Malattie Rare in collaborazione con altri Registri Nazionali e Internazionali delle Malformazioni Congenite. In tale ambito hanno particolare rilievo sia i programmi per definire la prevalenza di malformazioni congenite rare che le attività relative alla prevenzione delle malformazioni congenite associate alla carenza e/o difetti del metabolismo dei folati.

Perciò per prevenire sia disordini congeniti nel concepito sia rischi anche per la madre, occorrono campagne di formazione degli operatori sanitari e di educazione sanitaria, al fine di informare sia sulle patologie associate ai disturbi dei folati sia sull'opportunità di supplementare nel periodo periconcezionale la donna in età fertile con AF. Questo può anche includere, più in generale, la fortificazione di alcuni alimenti di complessi vitaminici; occorre tuttavia dare attenzione alle dosi di nutrienti che potrebbero, al contrario, essere dannosi come ad esempio, la teratogena vitamina A. In tale ambito, vanno anche considerate alcune recenti indicazioni che un eccesso di AF possa aumentare la frequenza di gemellarità e, di conseguenza, i rischi a essa associati. Pertanto, le supplementazioni vitaminiche dovrebbero essere considerate sempre con controllo medico e se realmente la donna in gravidanza ne ha necessità. Infatti il problema dovrebbe essere valutato con attenzione soprattutto per quelle fasce di popolazione femminile maggiormente a rischio, ad esempio, che vivono a contatto con determinati composti in un ambiente non protetto o che presentano patologie dismetaboliche.

Questo rapporto, nato da un incontro multidisciplinare, ha voluto considerare che anche alterazioni di disponibilità vitaminiche possono essere dannose sia per il concepito che per la madre e in particolare con questo lavoro ha inteso valutare i dismetabolismi dell'AF da varie angolazioni scientifiche. Dall'importanza di quanto è emerso, risulta infine auspicabile che venga data rilevanza anche ai rischi associati a carenze, eccessi e/o alterazioni metaboliche di altre vitamine, quali ad esempio, la vitamina A.

*Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità
e Direttore responsabile: Enrico Garaci*

*Coordinamento redazionale:
Paola De Castro e Sandra Salinetti*

*Stampato dal Servizio per le Attività Editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, settembre 2002 (n. 3) 7° Suppl.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*