

Caleidoscopio *Italiano*

Presentazione
Paolo Mantegazza

Giuseppe Scalabrino, Daniela Veber, Elena Mutti

Nuovi orizzonti biologici per la vitamina B₁₂

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

192

... il futuro ha il cuore antico  MEDICAL SYSTEMS SpA

Caleidoscopio

Italiano

Presentazione
Paolo Mantegazza



Giuseppe Scalabrino, Daniela Veber, Elena Mutti

Istituto di Patologia Generale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Centro di Eccellenza per lo Studio delle Malattie Neurodegenerative, Università degli Studi di Milano, Milano

Nuovi orizzonti biologici per la vitamina B₁₂

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

192

... il futuro ha il cuore antico  MEDICAL SYSTEMS SpA

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI



INFORMAZIONI GENERALI. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'International Committee of Medical Journal Editors. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

TESTO. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte ovvero 100-130.000 caratteri (spazi inclusi). Si invita a dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2) Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi.

TABELLE E FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

UNITÀ DI MISURA. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre il dattiloscritto, le fotografie, una copia del testo in formato .doc oppure .rtf, ed copia di grafici e figure in formato Tiff con una risoluzione di almeno 240 dpi, archiviati su CD in buste separate.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista *Caleidoscopio* rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41).

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al seguente indirizzo:

Restless Architect of Human Possibilities sas
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Caleidoscopio

Italiano

Editoriale

Presentiamo in questo editoriale gli Autori di questa splendida monografia, lasciando con vivo piacere al Prof. Paolo Mantegazza, Rettore Emerito dell'Università degli Studi di Milano, la Presentazione del volume.

Gli Autori svolgono la loro attività scientifica presso l'Istituto di Patologia Generale della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Milano e sono membri del Centro di Eccellenza per lo studio delle Malattie Neurodegenerative dell'Università degli Studi di Milano fondato dal Prof. Guglielmo Scarlato.

Il Prof. Giuseppe Scalabrino si è laureato, sotto la guida del Prof. Enrico Ciaranfi, in Medicina e Chirurgia presso l'Università degli Studi di Milano; è diventato Professore Associato e infine Professore Ordinario di Patologia Generale nella Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Milano. Ha lavorato con una borsa di studio bandita dalla N.A.T.O. presso l'Istituto di Biochimica dell'Università di Helsinki sotto la guida del Prof. J. Jänne. Per numerosi anni si è occupato di "poliamine e tumori" e nell'ambito di questa tematica è stato invitato come relatore a partecipare a conferenze internazionali. Per le sue ricerche su poliamine e tumori è risultato vincitore del Premio Internazionale "Röntgen" bandito dall'Accademia Nazionale dei Lincei per studi e ricerche in campo oncologico. Da circa un ventennio si occupa del ruolo della vitamina B₁₂ nelle patologie sperimentali e umane collegate ad una sua carenza. In anni recenti egli è stato Direttore dell'Istituto di Patologia Generale e coordinatore del Comitato per le Scienze Mediche nell'ambito della Commissione di Ateneo per la Ricerca Scientifica. E' autore di numerose pubblicazioni su qualificate riviste internazionali.

La Dott.ssa Daniela Veber ha conseguito la laurea in Scienze Biologiche presso la Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali dell'Università degli Studi di Milano presentando una tesi sul neurotrofismo della vitamina B₁₂ svolta nel laboratorio del Prof. Giuseppe Scalabrino. Ha conseguito il

titolo di Dottore di Ricerca in “Patologia e Neuropatologia Sperimentali” presso l’Istituto di Patologia Generale dell’Università degli Studi di Milano e a tutt’oggi lavora presso il laboratorio del Prof. Scalabrino in qualità di assegnista di ricerca della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell’Università degli Studi di Milano.

La Dott.ssa Elena Mutti ha conseguito la laurea in Biotecnologie Mediche presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell’Università degli Studi di Milano presentando una tesi sul neurotrofismo della vitamina B₁₂ svolta nel laboratorio del Prof. Giuseppe Scalabrino. Ad oggi lavora nel laboratorio del Prof. Scalabrino in qualità di Dottoranda di Ricerca in “Patologia e Neuropatologia Sperimentali” dell’Università degli Studi di Milano.

Sergio Rassu

*Il y a assez de lumière pour ceux qui ne désirent que de voir,
et assez d'obscurité pour ceux qui ont une disposition con-
traire.*

B. PASCAL, Pensées, A P.R., Pour Demain 2

*He [the analyst] makes, in silence, a host of observations
and inferences. So, perhaps, do his companions; and the dif-
ference in the extent of the information obtained, lies not so
much in the validity of the inference as in the quality of the
observation. The necessary knowledge is that of **what** to
observe.*

E. A. POE, The Murders in the Rue Morgue

*Le seul véritable voyage, le seul bain de jouvence, ce ne
serait pas d'aller vers de nouveaux paysages, mais d'avoir
d'autres yeux, de voir l'univers avec les yeux d'un autre, de
cent autres, de voir les cent univers que chacun d'eux voit,
que chacun d'eux est....*

*M. PROUST, À La recherche du temps perdu, La prison-
nière*

Presentazione

Accolgo con piacere l'invito rivoltomi dal Prof. Giuseppe Scalabrino di presentare questo "volumetto", stringato ma al tempo stesso aggiornatissimo, sulla vitamina B₁₂ e le patologie umane collegate alla sua carenza. Lo scritto, oltre a riassumere nozioni ormai classiche di biochimica, patologia sperimentale e clinica, tocca anche attuali problematiche di neurobiologia e la neuropatologia.

Il Prof. Giuseppe Scalabrino, avvalendosi della collaborazione delle Dott.sse Veber e Mutti, ha dimostrato, grazie alla sua cultura biologica e medica, quale sia la vitalità e l'attualità della ricerca clinica e sperimentale sulla vitamina B₁₂, della quale si pensava di sapere tutto o quasi!

A mio parere si tratta di un'iniziativa ben riuscita: infatti il contenuto esauriente e compiutamente esposto, insieme alla forma semplice e scorrevole, rendono accessibili, anche per coloro che non ne abbiano dimestichezza, concetti biochimici e neurobiologici non tra i più semplici.

Il Prof. Scalabrino ha assolto questo compito nel tentativo ben riuscito di interpretare molti nuovi risultati nel siero e nel liquido cefalorachidiano di pazienti con grave patologia da carenza di vitamina B₁₂ alla luce dei risultati ottenuti nel modello sperimentale da lui proposto.

Ritengo che il risultato più significativo delle pluriennali ricerche del Prof. Scalabrino, sempre seguite da me con interesse, sia l'aver dimostrato sperimentalmente e clinicamente una nuova patogenesi della degenerazione subacuta combinata, basata sull'identificazione di nuove funzioni della vitamina B₁₂ come modulatore della sintesi di alcune citochine e alcuni fattori di crescita nel sistema nervoso centrale del ratto.

Mi piace infine qui ricordare che tale patogenesi ha ottenuto un favorevole riscontro da parte di specialisti internazionali, come è dimostrato dal fatto che alle ricerche del Prof. Scalabrino è stata dedicata una "review" su un'importante rivista statunitense (J. W. Miller, Nutrition Reviews 60, 142-144, 2002).

Prof. Paolo Mantegazza

Rettore Emerito dell'Università degli Studi di Milano

Professore Emerito di Farmacologia

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Università degli Studi di Milano

Ai lettori: storia di un libro

Le mie ricerche sulla vitamina B₁₂ sono nate da un'osmosi avvenuta in anni assai lontani tra le mie esperienze di docente e di ricercatore. Dapprima, quando lavoravo con il mio Maestro, il Prof. Enrico Ciaranfi, lo sentii ripetutamente citare il megaloblasto come un raro esempio di anomalia della differenziazione cellulare analoga per molti versi a quelle riscontrate nelle cellule neoplastiche, ma -a differenza di queste- "guaribile" con la somministrazione di una vitamina. Indi, un corso monografico (a quei tempi si chiamava così!), richiestomi dagli studenti del mio corso di Patologia Generale della Facoltà di Medicina e Chirurgia, sulla patologia biochimica delle malattie eritrocitarie mi fece nascere l'idea di un nuovo modello sperimentale, il ratto totalmente gastrectomizzato, per riprodurre il quadro neuropatologico tipico dell'anemia perniciososa. La realizzazione di quest'idea ha segnato irrevocabilmente la mia attività di ricercatore da vent'anni in qua.

Come è quasi superfluo ricordare, per la realizzazione di ogni valido progetto occorre anche una compartecipazione della fortuna: la "serendipità" si manifestò nel fatto che nel midollo spinale dei ratti totalmente gastrectomizzati l'attività dell'ornitina decarbossilasi (il primo enzima della via biosintetica delle poliamine) era aumentata. Questo primo ed imprevisto risultato rappresentò per me, oncologo sperimentale di formazione e in particolare "poliaminologo", la prima pietra su cui fondare il proseguimento della ricerca sulla patologia da carenza di vitamina B₁₂. Indi, ho proseguito il viaggio nella patogenesi della neuropatia da carenza di vitamina B₁₂ (cioè la degenerazione subacuta combinata) "con occhi diversi" da quelli tradizionali, arrivando a proporre una nuova patogenesi per questa malattia. Essendo io medico sia per laurea che per formazione intellettuale e culturale, ho ritenuto ineludibile cimentarmi con la clinica, nel senso che ho inteso verificare se la nuova patogenesi emersa dalle ricerche sperimentali sui ratti totalmente gastrectomizzati potesse essere estensibile anche alla degenerazione subacuta combinata. L'esito positivo di queste ricerche cliniche ben saldandosi con quello delle ricerche sperimentali, mi ha ulteriormente stimolato a proseguire nell'identificazione delle basi molecolari dell'azione neurotrofica della vitamina B₁₂.

Negli ultimi anni ho avuto al mio fianco le Dott.sse Daniela Veber e Elena Mutti, le quali hanno contribuito in misura determinante a dare nuovo impulso alle ricerche del nostro laboratorio sulle basi molecolari dell'attività neurotrofica della vitamina B₁₂. Le Dott.sse Veber e Mutti hanno avuto almeno il coraggio di condividere con me la parte terminale di questo affascinante ma temerario viaggio scientifico, una tappa del quale è rappresentata

appunto dalla stesura dell'opuscolo che ora vede la luce: dalla continua e fertile discussione con loro sono maturate non poche idee di impostazione dei vari capitoli.

Da tutte queste premesse risulta chiaro che questo volumetto non vuole essere solo un registro di lavori scientifici altrui e nostri sulla vitamina B₁₂ nelle malattie umane dovute al suo deficit e nei differenti modelli sperimentali, ma anche e soprattutto un "instrumentum", mediante il quale il lettore, come avviene in un'esposizione di quadri, prende visione e ragiona intorno ad un particolare percorso della ricerca scientifica su una vitamina, fondendo nozioni ormai acquisite con le moderne problematiche di ricerca sperimentale e clinica sulla vitamina B₁₂ e le malattie (soprattutto quelle neurologiche) derivate dalla sua carenza. Questo opuscolo, contenendo lo "stato dell'arte" delle ricerche sulla vitamina B₁₂, vuole rappresentare una provocazione per il lettore (soprattutto se neofita) più che una mera rassegna bibliografico-critica della sterminata letteratura sulla vitamina B₁₂ e le malattie dovute alla sua carenza; esso, pur nella sua modestia e parzialità, ha la sola ambizione di suscitare dibattiti e, perché no, critiche più che di presentare certezze granitiche sulle funzioni biochimiche della vitamina B₁₂ nel sistema nervoso centrale dei mammiferi, uomo compreso. Se a questo saremo riusciti, la nostra modesta ma certamente non lieve fatica avrà già trovato una sua ragione di essere.

Last but not least, dovrei ringraziare troppe persone per essere certo di non fare torto ad alcuno. Solo una mi è impossibile dimenticare: il Prof. Paolo Mantegazza, che ha seguito gli alti e i bassi della mia ricerca sulla vitamina B₁₂, dandomi sempre suggerimenti e incoraggiamenti preziosi.

Giuseppe Scalabrino

1. La vitamina B₁₂

1.1. Cenni storici

Nel 1849 Thomas Addison (*Addison, 1849*), un medico del Guy's Hospital di Londra, pubblicò la prima descrizione di un gruppo di pazienti con una forma d'anemia sempre mortale. Da quel momento questo tipo di anemia acquistò il nome di "anemia di Addison" fino agli studi più approfonditi di Biermer (*Biermer, 1872*) che la ribattezzò anemia perniziosa (AP), nome con cui è nota tuttora o, alternativamente, con il nome di anemia di Addison-Biermer.

Nel 1893 Nonne (*Nonne et al., 1893*) affermò che la neuropatia dei pazienti con AP era l'equivalente neurologico dell'anemia stessa e non una malattia secondaria ad essa. In séguito, Russell pubblicò un articolo (*Russell et al., 1900*) in cui fu proposto il nome di degenerazione subacuta combinata (DSC) per definire la neuropatia osservata in associazione con l'AP. Tuttavia, la frequente mancanza di correlazione clinica tra il grado di anemia e la gravità della neuropatia sarebbe però divenuta chiara solo più tardi (*Carmel, 1988; Lindenbaum et al., 1988*). Per trovare una possibile terapia a questa anemia furono però necessari gli studi di Whipple, il quale ipotizzò che il fegato potesse svolgere una funzione ematopoietica e che nei pazienti affetti da AP anche le cellule della serie rossa mancassero di una sostanza contenuta appunto in larga misura nel fegato (*Whipple et al., 1920*). Infine, *Minot e Murphy (1926)* dimostrarono l'efficacia terapeutica della somministrazione di fegato crudo a pazienti affetti da AP.

Successivamente, negli anni '30 del secolo scorso, Castle, nel suo tentativo di spiegare il nesso causale tra l'achilia gastrica e l'AP, giunse alla conclusione che per restituire una normale ematopoiesi a pazienti affetti da AP era necessaria l'interazione tra un fattore estrinseco contenuto nei cibi, nella fattispecie nella carne cruda (specialmente fegato), e un fattore chiamato intrinseco (FI) contenuto normalmente nel succo gastrico umano (*Castle, 1937*).

Solo nel 1948 Folkers e i suoi collaboratori (*Rickes et al., 1948a*) isolarono dal fegato di bue un composto di colore rosso, che induceva un rapido aumento dell'eritropoiesi nei pazienti con AP ed era un fattore di crescita per il *Lactobacillus Lactus*. A tale composto fu dato il nome di vitamina B₁₂. Usando il saggio di crescita del *Lactobacillus Lactus*, fu possibile scoprire che la vitamina B₁₂ era contenuta nel latte, nelle carni e nel brodo di coltura di alcuni ceppi batterici quali il *Mycobacterium Smegmatis*, il *Lactobacillus Arabinosus*, il *Bacillus Subtilis* e diverse specie di *Streptomyces* (*Rickes et al., 1948b*). Nello stesso periodo *Smith e Parker (1948)* purificarono dal fegato di

bue un fattore anti-anemico pernicioso, che si scoprì essere identico al precedente.

Nel 1949 Ellis e i suoi collaboratori (Ellis *et al.*, 1949), dopo aver cristallizzato il fattore anti-anemico pernicioso, ne caratterizzarono lo spettro elettronico. Subito dopo aver isolato la forma cristallina della vitamina B₁₂, ebbero inizio gli studi per determinarne la struttura. Folkers e i suoi collaboratori (Brink *et al.*, 1950) pubblicarono il primo studio sull'analisi elementare strutturale della vitamina B₁₂, che portò ad identificare la formula della vitamina in C₆₃H₈₈O₁₄N₁₄O₁₃PCo. L'anno successivo si scoprì che sulla vitamina B₁₂ era presente uno ione cianuro. Fu necessario però attendere nel 1955 l'analisi cristallografica ai raggi X del laboratorio della Hodgkin per la definitiva delucidazione sulla struttura della vitamina B₁₂, che contiene un unico anello corrinico con 4 anelli pirrolici (Hodgkin *et al.*, 1955).

1.2. Cenni sulla struttura chimica della vitamina B₁₂

Dal punto di vista strutturale la vitamina B₁₂ appartiene alla famiglia dei corrinoidi, molecole naturali costituite da anelli corrinici. Due sono le componenti che caratterizzano la struttura di queste molecole: (a) un anello corrinico planare (come le porfirine) con quattro anelli pirrolici ridotti (indicati nella Figura 1 con le lettere da A a D), di cui due (A e D) sono direttamente legati tra loro, mentre gli anelli A e B, e C e D sono legati da ponti carbonio-metile come nelle porfirine. Inoltre questi anelli pirrolici sono legati al centro con un atomo di Co, il cui stato di ossidazione e riduzione cambia in base alla sua interazione con quattro atomi di azoto, ciascuno dei quali è situato in ciascun anello pirrolico; (b) un nucleotide localizzato planarmente sotto l'anello tetrapirrolico e perpendicolarmente all'atomo di Co (in posizione assiale α) e costituito da un derivato del dimetilbenzimidazolo (il 5,6 dimetil-benzimidazolo) legato tramite legame α -glicosidico al ribosio-3-fosfato, che a sua volta lega l'aminoisopropanolo (il gruppo 1-amino-2-propanolico) (vedi Figura 1). L'atomo di Co può avere stato ossidativo +1, +2, +3 e ha sei siti di coordinazione, dei quali quattro sono occupati da un atomo di azoto, e i due restanti sono rispettivamente occupati dal dimetilbenzimidazolo e da un ligando (R) nella posizione β sopra l'anello tetrapirrolico. In mancanza del ligando (R) la molecola prende il nome di cobalamina (Cbl): ne consegue che le varie forme di Cbl dipendono dal tipo di ligando che occupa l'unico legame di coordinazione libero del Co. Il ligando può essere costituito da un'adenina (adenosilcobalamina (Ado-Cbl)), da un gruppo metile (a formare la metilcobalamina (Me-Cbl)), da un gruppo ossidrilico (a formare la idrossicobalamina (OH-Cbl)), oppure da un gruppo cianuro (a formare la cianocobalamina (CN-Cbl)) (vedi Figura 1). La CN-Cbl è la vitamina B₁₂ propriamente

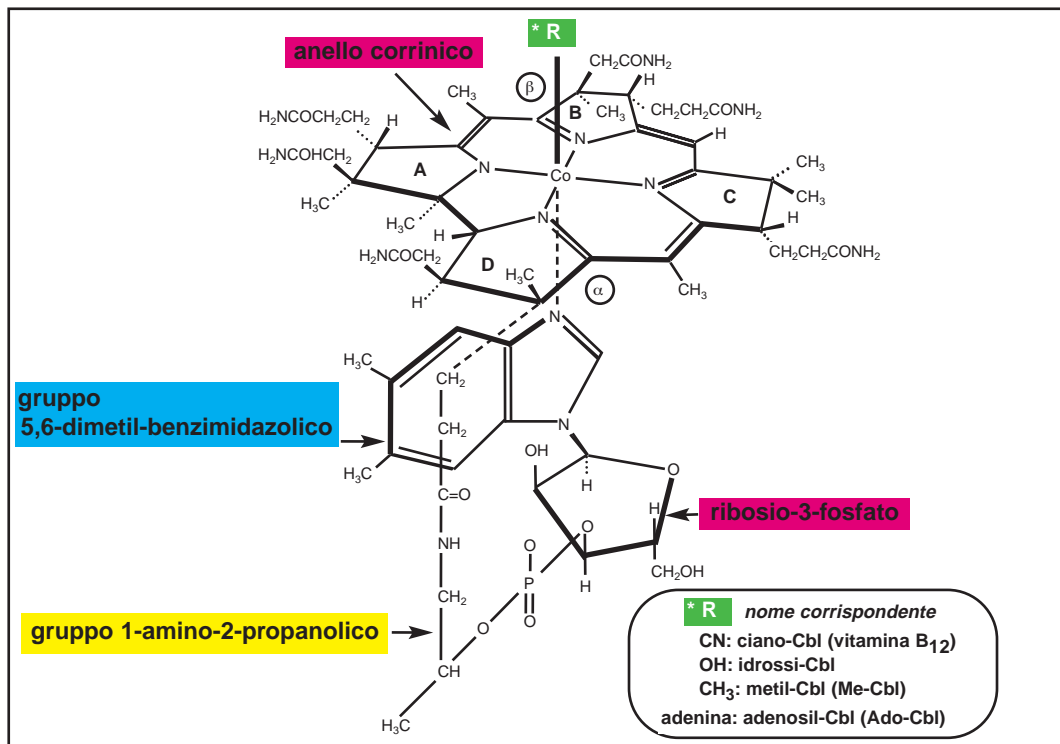


Figura 1. Formula di struttura della Cbl e dei suoi derivati.

detta, anche chiamata universalmente Cbl, sia pure con qualche imprecisione. Solo la Ado-Cbl e la Me-Cbl agiscono come coenzimi nelle cellule eucariotiche. La CN-Cbl è invece la forma farmacologica più comune della vitamina. Anche lo stato di ossidazione-riduzione dell'atomo di Co è determinante per il funzionamento della vitamina. Quando l'atomo di Co è nello stato ossidato e trivalente, si parla di Cbl(III); l'atomo di Co deve essere ridotto da specifici enzimi (riduttasi) all'interno della cellula, prima allo stato divalente (Cbl(II)) e poi allo stato monovalente (Cbl(I)) prima che la 5-adenosina (per la Ado-Cbl) o un gruppo metile (per la Me-Cbl) possa legarsi ad esso.

1.3. Il trasporto della vitamina B₁₂ nel sangue, il suo assorbimento intestinale e la sua penetrazione endocellulare

1.3.1. Assorbimento intestinale

L'uomo deve assumere la vitamina attraverso i cibi in quanto solo alcu-

ni ceppi batterici (tra i quali alcuni saprofiti dell'intestino) sintetizzano la Cbl (Martens et al., 2002). L'assorbimento della Cbl derivata dagli alimenti avviene a livello degli enterociti, a séguito dell'intervento dei succhi gastrici e pancreatici. Esiste anche una ricircolazione entero-epatica della Cbl, mediante la quale una parte della Cbl circolante viene riversata nel succo biliare e da questo nell'intestino tenue dove viene in parte riassorbita dopo essersi legata al FI seguendo quindi la stessa via della Cbl esogena.

La Cbl contenuta negli alimenti viene dapprima rilasciata da essi grazie all'azione del succo gastrico a basso pH, successivamente si lega a proteine, quali le proteine R o aptocorrine, presenti nella saliva e nel succo gastrico. Il legame tra la vitamina e queste proteine viene scisso a livello del duodeno dall'azione delle proteasi (tripsina, chimotripsina, ecc.) del succo pancreatico. Sempre a livello del duodeno, la Cbl si lega poi al FI, una glicoproteina prodotta dalle cellule parietali del cardias e del fundus dello stomaco. Il recettore per il complesso FI-Cbl permette la sua endocitosi all'interno degli enterociti dell'ileo. Súbito dopo l'endocitosi di questo complesso all'interno degli enterociti, il FI viene degradato nei lisosomi, la vitamina si lega alla proteina di trasporto denominata transcobalamina II (TCII) e alla fine viene secreta nel sangue dalla membrana basolaterale dell'enterocita unita alla TCII. Il complesso TCII-Cbl entra nel sangue portale e si lega a specifici recettori per la TCII (TCII-R) presenti sulle superfici delle cellule dell'organismo. Questo complesso viene quindi internalizzato nella cellula e, grazie al pH acido presente nei lisosomi, viene degradato liberando la TCII. La Cbl ormai libera può essere trasformata nelle sue forme coenzimatiche attive (Scalabrino, 2001). La megalina (MG) è un altro recettore che lega il complesso TC-Cbl e lo internalizza (Christensen et al., 2002; Verroust et al., 2002a, b). Le principali tappe dell'assorbimento della Cbl nell'uomo e del suo trasporto sono riportate nella Figura 2.

Piccole quantità di Cbl libera nel sangue vengono eliminate giornalmente attraverso le vie urinaria, biliare e fecale, mentre quantità ancora minori sono eliminate con le lacrime, il sudore e le cellule desquamate della cute (Grasbeck et al., 1958; Register and Sarett, 1951). La quantità di Cbl totale escreta dai soggetti sani con le urine varia con un valore medio di 31-43 ng/24 ore. La via principale di escrezione rimane però quella biliare. Si è osservato infatti che dopo l'iniezione di Cbl marcata molta della vitamina che compare nelle feci è di origine biliare. Nell'uomo 0,5-5 µg di Cbl/24 ore sono escreti con la bile, anche se circa il 65-75% di questa è riassorbita a livello intestinale grazie al FI. Questa circolazione enteroepatica costituisce un efficace meccanismo di conservazione della Cbl all'interno dell'organismo (Linnell, 1975; Combs, 1998).

1.3.2. Il fattore intrinseco

Il FI è una glicoproteina di 45 Kilodalton (KDa) composta da un'unica subunità formata da un solo sito di legame per la Cbl e da più regioni di lega-

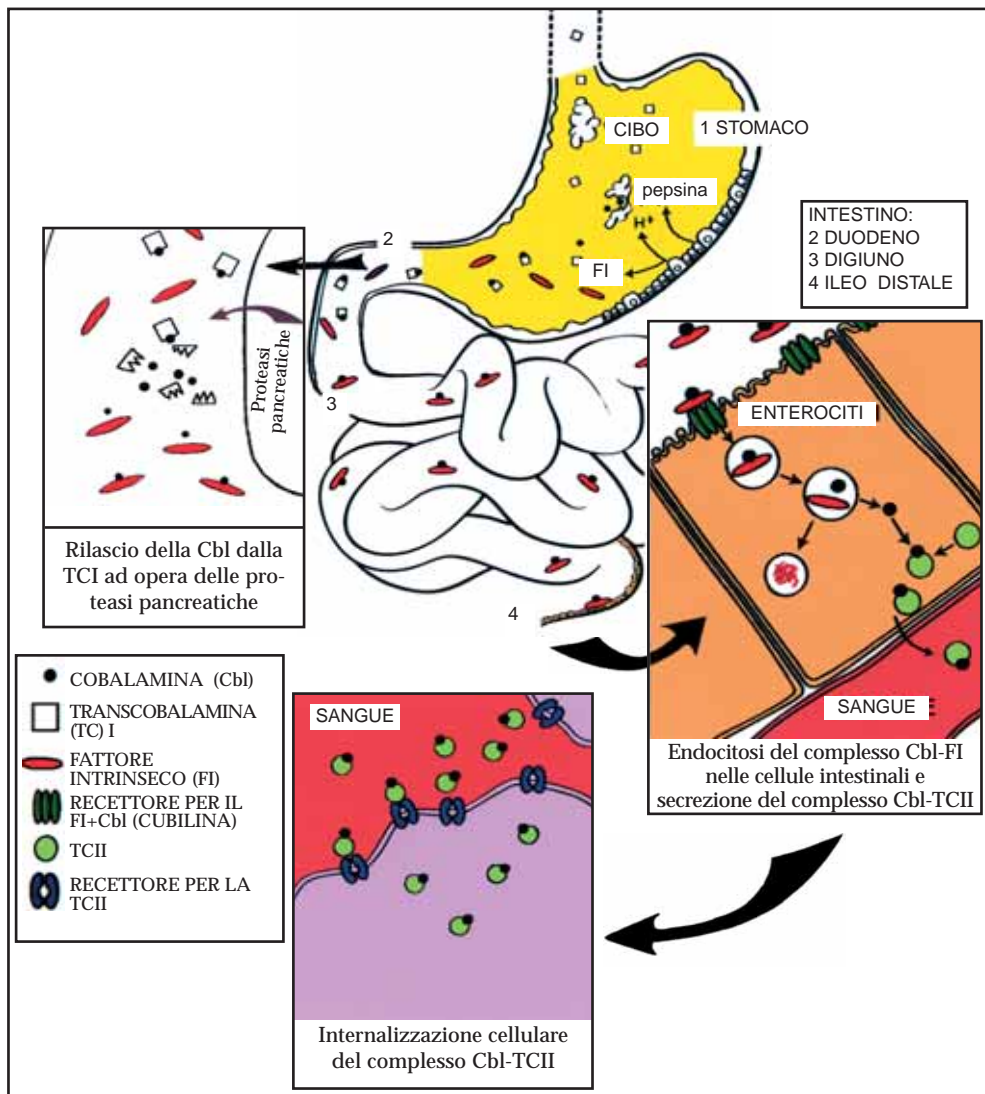


Figura 2. Rappresentazione delle principali tappe dell'assorbimento intestinale della Cbl e del suo trasporto endogeno ai tessuti nell'uomo.

me con la cubilina (CUB (si veda capitolo 1.3.3)) (Wen et al., 1997). Il gene del FI così come quello dell'aptocorrina sono localizzati nel cromosoma 11 (Hewitt et al., 1991). Il gene del FI è formato da 24 Kilobasi (Kb) e da 10 esoni* e 9 introni.**

(*Esone: regione della sequenza codificante di un gene che viene tradotta in

una proteina; **Introne: regione della sequenza codificante di un gene che non viene tradotta in una proteina).

1.3.3. La cubilina

Il recettore per il complesso FI-Cbl è una molecola di 460 KDa (*Birn et al., 1997*), denominata originariamente recettore per la Cbl e il FI (IFCR) e successivamente CUB per la presenza di un largo numero di domini* CUB (CUB è l'acronimo di Complement component C1r/C1s, Uegf and Bone morphogenic protein-1) all'interno della sua struttura (*Seetharam, 1999; Christens et al., 2001; Moestrup et al., 2001*). Tale recettore, espresso sulla membrana apicale degli enterociti della regione ileale, non è ancorato alla membrana dell'enterocita mediante domini transmembrana, ma il legame avviene grazie alla presenza della MG e ad un'interazione diretta con la membrana tramite una molecola di palmitato. Esiste una forma di CUB, immunologicamente uguale a quella intestinale, anche a livello del rene e del sacco vitellino. Il gene CUB è composto da 11.2 kb e codifica per una proteina formata da tre domini strutturali (*Moestrup et al., 1998*). In particolare, la regione N-terminale è composta da 113 residui, seguiti da otto sequenze ripetute simili a quelle presenti all'interno della molecola dell'Epidermal Growth Factor (EGF), e da un insieme di 27 domini CUB di 110 aminoacidi ciascuno. La CUB è in grado di legarsi a diversi tipi di ligandi: il complesso FI-Cbl, l'albumina, il complesso apolipoproteina A-I/lipoproteine ad alta densità, la transferrina, la catena leggera delle immunoglobuline, le proteine leganti la vitamina D (*Moestrup et al., 1998*).

(*Dominio: porzione di una catena polipeptidica che si ripiega su se stessa a dare un'unità compatta che rimane distinta all'interno della struttura terziaria della proteina. Le proteine di grandi dimensioni spesso sono costituite da diversi domini).

1.3.4. Il recettore per la transcobalamina

Il recettore per il complesso TCII-Cbl (TCII-R) è una proteina di 62 KDa, inizialmente sintetizzata come una proteina di 45 KDa, poi glicosilata per formare la glicoproteina finale (*Bose et al., 1995*) che contiene quattro ponti di solfuro al suo interno. Tali ponti di solfuro sono necessari per il legame della vitamina al ligando ma non interferiscono con la sua stabilità o con la sua veicolazione all'interno della cellula (*Bose et al., 1997*). Sulla superficie della membrana cellulare il complesso TCII-R si trova sotto forma di dimero, che rappresenta l'80-90% della sua quantità totale e conferisce ad esso la stabilità.

1.3.5. La megalina

La MG è un recettore di 600 KDa che si lega a molti ligandi diversi dalla Cbl (*Orlando et al., 1998; Sousa et al., 2000*). La MG è una proteina transmembrana, espressa su molti tipi di cellule epiteliali, appartenente alla famiglia

dei recettori per le lipoproteine a bassa densità (Raychowdhury et al., 1989). La porzione extracellulare della MG costituisce il suo dominio di legame e contiene quattro sequenze ricche di cisteina, le quali sono tra loro separate da sequenze simili a quelle contenute nell'EGF e da sequenze spaziatrici povere in cisteina contenenti "motivi"* tirosina-triptofano-treonina-acido aspartico (Davis et al., 1987). Queste sequenze spaziatrici consentono la dissociazione tra il recettore e il ligando ad un dato valore di pH. La coda citoplasmatica della MG contiene invece due "motivi" asparagina-prolina-X-tirosina, che consentono la formazione di vescicole necessarie per i processi di endocitosi (Davis et al., 1987). Una delle funzioni principali della MG è l'assorbimento del complesso TCII-Cbl circolante a livello del tubulo prossimale renale (Verroust et al., 2002a, b). Un'altra funzione della MG è anche quella di legarsi alla CUB e insieme a questa di veicolare il complesso FI-Cbl all'interno dell'enterocita mediante la formazione di un endosoma (Moestrup and Verroust, 2001). All'interno degli enterociti il complesso FI-Cbl si stacca dalla CUB e dalla MG e viene degradato dal lisosoma, mentre la CUB e la MG sono trasportate nuovamente verso la membrana cellulare (Moestrup and Verroust, 2001).

(*Motivo: sequenza aminoacidica altamente conservata in molte specie viventi).

1.3.6. Le aptocorrine

Il termine "aptocorrine" si riferisce ad una famiglia di glicoproteine immunologicamente identiche, che sono state denominate anche TCI o proteine R. Queste sono tutte glicoproteine di 46 KDa che differiscono tra di loro solo a livello dei residui glucidici (Carmel, 1981). Questa differenza a livello dei residui glucidici produce lievissime differenze nelle caratteristiche fisico-chimiche che hanno portato ad una ingiustificata distinzione tra TCI e il sottogruppo TCIII, in realtà appartenenti tutte alla stessa famiglia (Carmel, 2004). L'aptocorrina è prodotta dai granulociti e dalle cellule dell'epitelio del tubulo renale. Il gene dell'aptocorrina è localizzato sul cromosoma 11 ed è costituito da 12 Kb con 9 esoni e 8 introni (Johnston et al., 1992).

1.3.7. La transcobalamina II

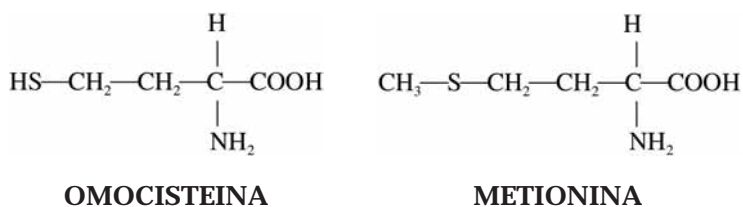
La TCII è un singolo polipeptide non glicosilato di 43 KDa, secreto dalle cellule endoteliali e da alcuni tipi di cellule epiteliali. Le cellule endoteliali risultano però essere le principali produttrici della TCII plasmatica. Il gene della TCII è situato sul cromosoma 22 ed è formato da 9 esoni e 8 introni. Il promotore di questo gene è caratterizzato dalla presenza di molte sequenze ricche in guanina-citosina.

1.4. Principali funzioni biochimiche della vitamina B₁₂ e la sua distribuzione tissutale

Per capire come la Cbl venga utilizzata nei diversi tessuti, è necessario descrivere il ruolo dei due enzimi Cbl-dipendenti nelle cellule eucariotiche (vedi Figura 3): la *L*-metilmalonilcoenzima A (MMCoA) mutasi (EC 5.4.99.2) e l'omocisteina-metiltransferasi (anche conosciuta come metionina sintetasi (EC 2.1.1.13)).

(a) Nei mitocondri la Cbl(I) riceve la 5-deossiadenosina dall'adenosina trifosfato (ATP), trasformandosi così in Ado-Cbl ad opera della adenosiltransferasi. La Ado-Cbl è il coenzima della *L*-MMCoA mutasi che catalizza la conversione del *L*-MMCoA in succinil-CoA. Questa reazione è una tappa del catabolismo dell'acido propionico. L'acido propionico entra nelle reazioni metaboliche attraverso una carbossilazione biotina-dipendente del propionil-CoA, che dà come risultato la formazione del *D*-MMCoA, un suo α -carbossiderivato. Dopo la reazione di racemizzazione del *D*-MMCoA a *L*-MMCoA, la *L*-MMCoA mutasi in presenza di Ado-Cbl catalizza la conversione reversibile del *L*-MMCoA a succinil-CoA, il quale è il suo carbossi-isomero e dopo deacilazione entra nel ciclo degli acidi tricarbossilici. Il propionil-CoA deriva anche dal metabolismo di molti aminoacidi, quali valina, isoleucina, treonina, metionina, e dalla β -ossidazione degli acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio (Beck, 1975).

(b) Nel citoplasma la metionina sintetasi richiede la Me-Cbl come coenzima per catalizzare la conversione dell'omocisteina (OMOCIS) in metionina e del N⁵-metiltetraidrofolato (N⁵-metilFH₄) in tetraidrofolato (FH₄) (vedi Figura 3) (Matthews, 1999).



La Cbl funge da trasportatore di gruppi metili e normalmente oscilla tra Cbl(I) e Cbl(III) (Matthews, 1999): infatti in séguito alla conversione dell'OMOCIS in metionina, la Cbl viene convertita in Cbl(I), che ricevendo il gruppo metile del N⁵-metilFH₄ si rigenera a Me-Cbl formando il FH₄ (vedi Figura 3). Durante questo ciclo della Cbl solo occasionalmente avviene la spontanea ossidazione della Cbl(I) a Cbl(II), che inattivando la metionina sintetasi, rende necessaria una sua successiva riduzione a Cbl(I) affinché il gruppo metilico possa legarsi. Recenti studi hanno dimostrato che la Cbl regola la

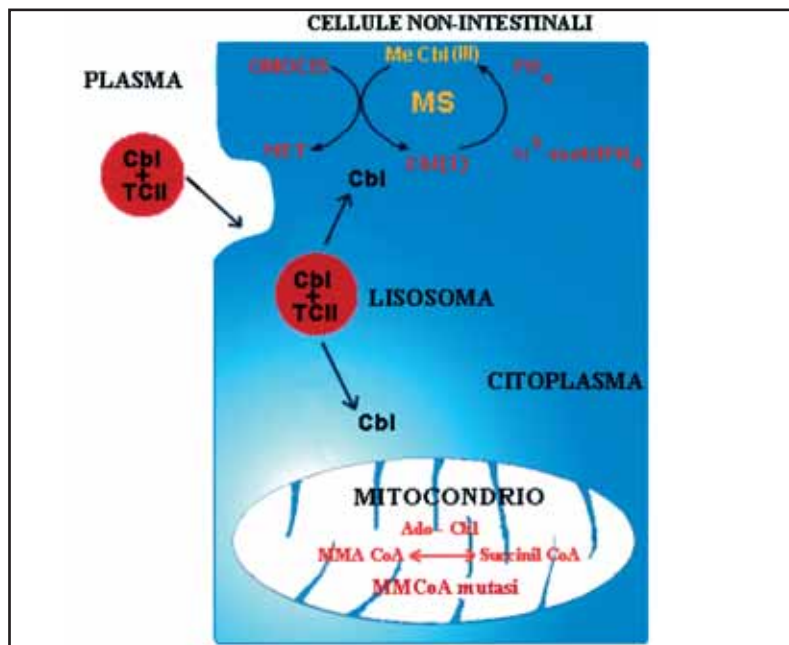


Figura 3. I due enzimi Cbl-dipendenti, uno citoplasmatico e l'altro mitocondriale e il collegamento delle due reazioni Cbl-dipendenti con le altre principali vie metaboliche. (Ado-Cbl= adenosilcobalamina; Cbl= cobalamina; FH₄= tetraidrofolato; Me-Cbl(III)= metilcobalamina(III); MMCoA= metilmalonilcoenzima A; MET= metionina; MS= metionina sintetasi; N⁵-metiltetraidrofolato; OMOCIS= omocisteina; TCII= transcobalamina II).

sintesi della metionina-sintetasi *in vitro* (Oltean *et al.*, 2003). La S-adenosil-metionina (SAM) si forma in una reazione catalizzata dalla metionina-adenosil-trasferasi (EC 2.5.1.6) in seguito al trasferimento di una molecola di adenosina dall'ATP all'atomo di zolfo della metionina. La SAM è il donatore di gruppi metilici in molte reazioni che avvengono nel sistema nervoso centrale (SNC) e riguardano le monoamine, i neurotrasmettitori, le proteine, le nucleoproteine, la melatonina e i fosfolipidi di membrana, come ad esempio la sintesi della colina, i cui tre gruppi metilici derivano dalla SAM (Combs, 1998; Ikeda *et al.*, 1998).

La concentrazione tissutale di Cbl è molto più bassa di quella di tutte le altre vitamine (Linnell, 1975). Nell'organismo umano la quantità totale di Cbl varia normalmente tra 2 e 5 mg e la Ado-Cbl ne è la forma presente in maggior concentrazione. Nel fegato la quantità di Cbl ammonta all'incirca a 1,5 mg e rappresenta la più alta in confronto con ogni altro organo. Nel muscolo la quantità di Cbl è circa 1 mg (Combs, 1998). La concentrazione della Cbl in alcuni principali organi o tessuti umani è riportata nella Tabella 1.

Tessuto	Cbl totale ng/g	Me-Cbl ng/g	Ado-Cbl ng/g	OH-Cbl ng/g
Fegato	1048	12.7	656	380
Rene	134	34	71	29
Milza	63	23	27	13
Encefalo	81	6	50	25
Midollo osseo	13	1.7	7	4.3
Leucociti	3.8	0.7	1.9	1.2
Eritrociti (ng/ml)	0.2	0.05	0.05	0.1

I dati sono tratti da Linnell (1975).

Tabella 1. Concentrazioni di Cbl totale, Me-Cbl, Ado-Cbl e OH-Cbl in alcuni organi e in alcuni stipiti cellulari dell'uomo. (Ado-Cbl= adenosilcobalamina; Me-Cbl= metilcobalamina; OH-Cbl= idrossilcobalamina).

1.5. Una nuova funzione non-coenzimatica della vitamina B₁₂

Le ricerche condotte nel nostro laboratorio da numerosi anni hanno fornito numerosi dati sperimentali, avvalorati anche da alcune nostre ricerche cliniche, in favore dell'ipotesi che la Cbl svolga la sua importante funzione neurotrofica nel SNC dei mammiferi anche attraverso meccanismi indipendenti dalle sue funzioni coenzimatiche. Questa identificazione di nuove funzioni della Cbl è stata resa possibile mediante la precedente messa a punto di un nuovo modello sperimentale per riprodurre la DSC: il ratto totalmente gastrectomizzato (TGX) (Scalabrino et al., 1990). La gastrectomia totale (GT) induce nel ratto (così come nell'uomo) un'immediata deficienza del FI e causa pertanto un successivo stato di permanente carenza di Cbl. Il ratto TGX è ad oggi il solo modello sperimentale che riproduce molte delle anomalie neurologiche e non, tipicamente riscontrate in pazienti con AP, quali ad esempio: la diminuzione dei livelli di Cbl nel siero, nel liquido cefalorachidiano e nel midollo spinale (Scalabrino et al., 1990, 1997); l'anemia (che è ipocromica, essendo la megaloblastosi esclusiva della specie umana (Scalabrino et al., 1990)); la DSC, in particolare la neuropatia centrale con le caratteristiche lesioni mielinolitiche (dovute all'edema intramielinico e a quello intersti-

ziale) della sostanza bianca del SNC (Scalabrino *et al.*, 1995, 1997; Tredici *et al.*, 1998a) (vedi Figura 4, riquadri da D a F e Figura 5, riquadro B); l'“attivazione” delle cellule macro- e micro-gliali della sostanza bianca del SNC; l'aumento dell'immunoreattività degli astrociti per la proteina fibrillare acida (GFAP) nella sostanza grigia; la riduzione della velocità di conduzione nervosa nel sistema nervoso periferico (SNP). Tutte queste anomalie e lesioni nei ratti TGX vengono parzialmente o completamente corrette dal trattamento postoperatorio con Cbl (vedi Figura 5, riquadro C) e devono pertanto essere

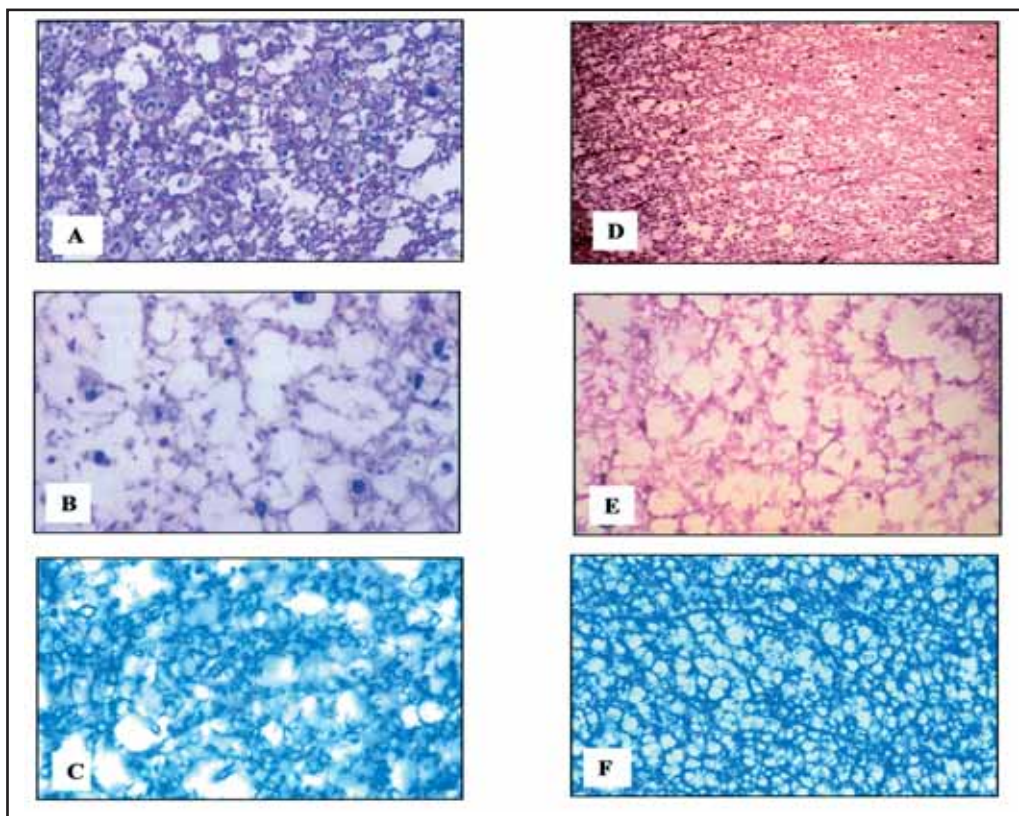


Figura 4. Sezioni istologiche della sostanza bianca del midollo spinale umano con DSC (riquadri A, B e C) e del midollo spinale di un tipico ratto TGX da 2 mesi (riquadri D, E) o da 3 mesi (riquadro F). L'ingrandimento per le sezioni dei riquadri D, E e F è: 250X. Colorazioni: Luxol fast blu/cresil violetto per le sezioni nei riquadri A, B, C e F; ematossilina e eosina per le sezioni nei riquadri D e E. Le fotografie nei riquadri A, B, C sono tratte da: “Neuropathology: A reference text of CNS pathology”. Ellison D., Love S., Eds., Elsevier Science, New York, 2004.

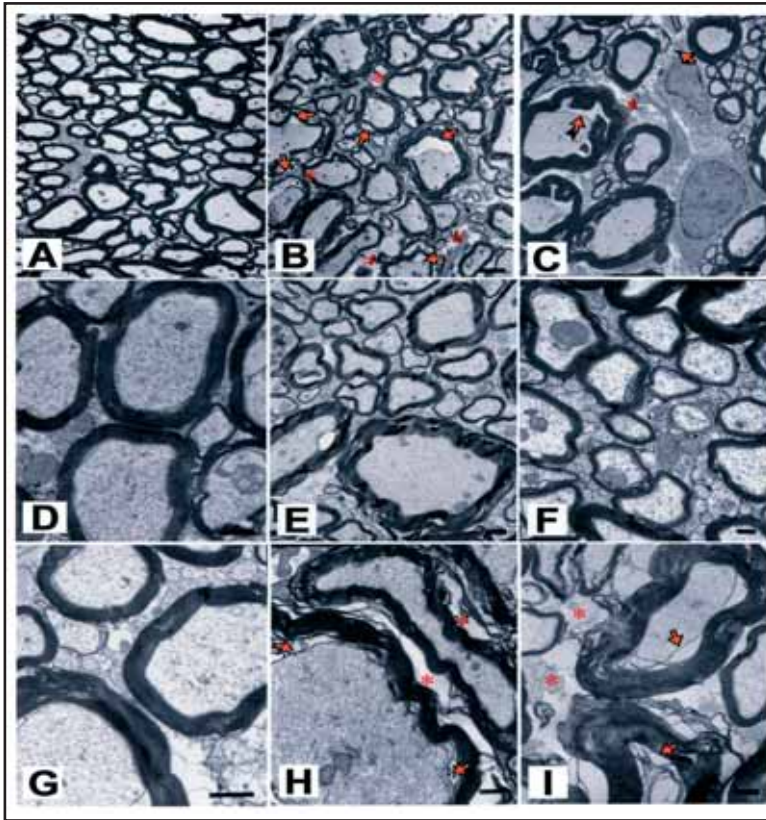


Figura 5. Fotografie al microscopio elettronico della sostanza bianca del midollo spinale di: (A) un ratto di controllo (laparotomizzato da 2 mesi); (B) un ratto TGX da 2 mesi; (C) un ratto TGX da 4 mesi e trattato con vitamina B₁₂ durante il terzo e quarto mese dopo la GT; (D) un ratto TGX da 2 mesi e trattato con anticorpi anti-TNF- α durante i primi due mesi successivi alla GT; (E) un ratto TGX da 2 mesi e trattato con microiniezioni i.c.v. di EGF durante i primi due mesi successivi alla GT; (F) un ratto TGX da 2 mesi e trattato con microiniezioni i.c.v. di IL-6 durante i primi due mesi successivi alla GT; (G) un ratto TGX da 2 mesi e trattato con microiniezioni i.c.v. di TGF- β durante i primi due mesi successivi alla GT; (H) di un ratto di controllo trattato con microiniezioni i.c.v. di TNF- α durante i primi due mesi successivi alla GT; (I) un ratto di controllo trattato con microiniezioni i.c.v. di anticorpi anti-EGF durante i primi due mesi successivi alla GT. Le barrette corrispondono a 0.5 μ m. Le frecce indicano l'edema intramielinico e gli asterischi indicano l'edema interstiziale. (Fotografie eseguite dal Prof. Giovanni Tredici).

ritenute specificamente connesse alla carenza della vitamina. Quasi tutti i danni morfologici e le anomalie biochimiche dei ratti TGX nella Tabella 2 sono stati anche riscontrati nei ratti alimentati cronicamente con una dieta priva di Cbl, benché il tempo richiesto per osservare tali danni morfologici e tali anomalie biochimiche in questi ratti sia molto più lungo di quello richiesto per i ratti TGX (per i danni morfologici vedi anche la Figura 6) (Scalabrino *et al.*, 1990, 1995; Tredici *et al.*, 1998a, b). Le principali lesioni del SNC e del SNP e altre anomalie osservate nei ratti TGX sono riportate nella Tabella 2.

Abbiamo anche dimostrato che la gravità delle lesioni neuropatologiche della DSC sperimentale nel midollo spinale dei ratti TGX non è correlata all'accumulo di acido metilmalonico (MMA) e OMOCIS nel loro siero e/o nel loro midollo spinale (Scalabrino *et al.*, 1997): con il trascorrere del tempo dalla GT non si osservava infatti un aumento della gravità delle lesioni mielinolitiche della sostanza bianca del midollo spinale. Questi risultati ci hanno por-

✓ Caratteristiche istopatologiche ed ultrastrutturali	● nel midollo spinale	-Vacuolizzazione spongiforme della sostanza bianca -Edema intramielinico ed edema interstiziale della sostanza bianca -Attivazione delle cellule macro- e micro-gliali della sostanza bianca -Aumento degli astrociti GFAP-positivi nella sostanza grigia
	● nel SNP	-Edema intramielinico -Edema endoneurale -Attivazione delle cellule di Schwann
✓ Anomalie sistemiche, biochimiche e funzionali		
- Anemia ipocromica - Diminuiti livelli di Cbl nel siero, nel liquido cefalorachidiano ed in alcuni organi, incluso il midollo spinale - Aumentati livelli di MMA nel siero ed in alcuni organi, incluso il midollo spinale - Aumentati livelli di OMOCIS nel siero ed in alcuni organi, incluso il midollo spinale - Riduzione della velocità di conduzione nervosa nel SNP		
✓ Tutte queste lesioni ed anomalie sono corrette dal trattamento post-operatorio con Cbl		
Cbl = cobalamina; GFAP = proteina gliale fibrillare acida; OMOCIS = omocisteina; MMA = acido metilmalonico; SNP = sistema nervoso periferico.		

Tabella 2. Principali lesioni morfologiche del sistema nervoso centrale e di quello periferico e le più significative anomalie funzionali e biochimiche osservate nel ratto totalmente gastrectomizzato.

tato quindi ad ipotizzare che le funzioni della Cbl non si esaurissero con quelle coenzimatiche e che il ruolo della Cbl nella patogenesi della DSC potesse implicare anche uno sbilanciamento di altri parametri cellulari. Abbiamo quindi ipotizzato che non la mera mancanza della vitamina, ma uno sbilanciamento indotto dalla carenza di Cbl nella produzione di alcune citochine e/o alcuni fattori di crescita nel SNC potesse avere un ruolo chiave nella patogenesi della DSC sperimentale nei ratti TGX. E' ampiamente noto che diversi tipi di cellule del SNC, principalmente le cellule gliali, producono e rilasciano grandi quantità di citochine e/o fattori di crescita (Brosnan et

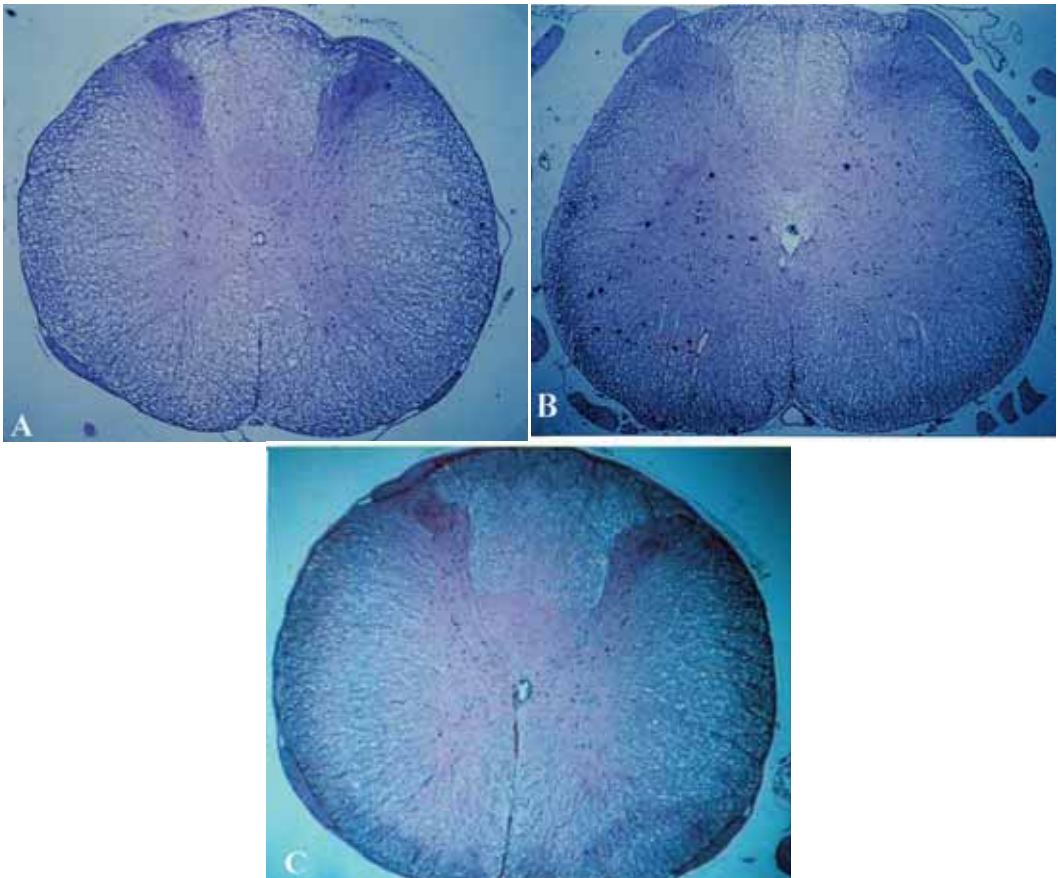


Figura 6. Microfotografie di sezioni coronali di differenti segmenti del midollo spinale di un ratto TGX da 2 mesi: (A) tratto toracico (colorazione: ematossilina e eosina); (B) tratto lombare (colorazione: ematossilina e eosina); e (C) sezione coronale del tratto toracico del midollo spinale di un ratto alimentato per 3 mesi con dieta priva di vitamina B₁₂ (colorazione: ematossilina e eosina) (ingrandimento: 125X).

al., 1995; Selmaj and Raine, 1995; Woodroffe, 1995; Stenberg, 1997; Benveniste, 1998; Vitkovic, 2000; Allan and Rothwell, 2001). Benché le citochine, scoperte per la prima volta nel contesto della comunicazione intercellulare nel sistema immunitario, siano multifunzionali e “pleiotropiche”, esse svolgono anche un ruolo chiave nella fisiologia del SNC e nella patogenesi di alcune malattie umane del SNC, dal momento che un’anomala loro sintesi è stata dimostrata nel SNC di pazienti con la sclerosi multipla, il morbo di Parkinson e la malattia di Alzheimer (Raivich et al., 1999). Da molti anni è stata posta l’attenzione sul ruolo svolto da alcune citochine, soprattutto dal tumor necrosis factor (TNF)- α , nella patogenesi di alcune malattie del SNC (sia umane che sperimentali), specialmente quelle caratterizzate da demielinizzazione (Brosnan, 1995; Selmaj and Raine, 1995; Vitkovic, 2000). Al contrario poco è ancora noto sul possibile ruolo della carenza di fattori neurotrofici nella patogenesi delle malattie neurodegenerative nell’uomo (Connor and Dragunow, 1998), benché queste molecole siano state largamente impiegate in terapia (Yuen and Mobley, 1996). L’EGF regola positivamente la proliferazione delle cellule gliali e/o il differenziamento dei neuroni (Yamada et al., 1997; Weisenhorn et al., 1999); l’interleuchina (IL)-6, che è una tipica citochina multifunzionale appartenente alla famiglia delle neurocitochine, può avere effetti talora benefici e talora dannosi sul SNC dei mammiferi (Gadient and Otten, 1997; Gruol and Nelson, 1997). Infatti, alcuni autori hanno dimostrato che l’IL-6 è coinvolta nella patogenesi di alcune malattie umane del SNC, come la malattia di Alzheimer (Blum-Degen et al., 1995), la malattia di Parkinson (Blum-Degen et al., 1995; Müller et al., 1998) e la sclerosi laterale amiotrofica (Sekizawa et al., 1998), ma è stato anche dimostrato che essa ha un’azione neurotrofica e neuroprotettiva nell’encefalite autoimmune sperimentale e contro vari tipi di neurotossicità (Rodriguez et al., 1994; Di Marco et al., 2001).

Il principale risultato delle nostre ricerche sperimentali è rappresentato dalla dimostrazione che la Cbl regola la sintesi di alcune citochine e di alcuni fattori di crescita nel SNC dei mammiferi: la carenza di Cbl determina nel SNC del ratto un’aumentata produzione di TNF- α , una molecola che danneggia la mielina, e una simultanea diminuita produzione di due molecole neurotrofiche, l’EGF e l’IL-6 (Buccellato et al., 1999; Scalabrino et al., 1999, 2002). Abbiamo infatti dimostrato che: (a) il livello della forma biologicamente attiva (17 KDa) della proteina del TNF- α aumenta nel midollo spinale dei ratti TGX due mesi dopo la GT, cioè quando si sono formate le lesioni tipiche della DSC (cioè l’edema intramielico e quello interstiziale), ma esso ritorna normale dopo ripetute iniezioni di Cbl ai ratti TGX (Buccellato et al., 1999); (b) ripetute microiniezioni intracerebroventricolari (i.c.v.) di TNF- α a ratti normali provocano sia edema intramielinico sia edema interstiziale nella sostanza bianca del midollo spinale, cioè lesioni identiche a quelle osservate nella DSC (Buccellato et al., 1999) (vedi Figura 5, riquadro H); (c) ripetute microiniezioni i.c.v. a ratti TGX di sostanze che riducono fortemente la produzione

cellulare di TNF- α (quali l'IL-6 ed il Transforming Growth Factor- β_1) (vedi Figura 5, rispettivamente i riquadri F e G) o lo inattivano (come anticorpi specifici anti-TNF- α) (vedi Figura 5, riquadro D) prevengono l'instaurarsi delle lesioni tipiche della DSC nella sostanza bianca del loro midollo spinale (Buccellato et al., 1999); (d) i livelli di EGF nel liquido cefalorachidiano di ratti TGX e di ratti resi carenti in Cbl mediante alimentazione carente della vitamina sono diminuiti significativamente e selettivamente fino quasi a non essere più misurabili (Scalabrino et al., 1999); (e) il deficit permanente di Cbl determina la scomparsa del RNA messaggero (mRNA) per l'EGF in diverse zone del SNC dei ratti TGX e dei ratti alimentati con dieta carente in Cbl (Scalabrino et al., 1999); (f) la somministrazione cronica di Cbl a ratti TGX ripristina normali livelli di EGF nel liquido cefalorachidiano e dell'espressione del suo mRNA nelle varie zone del SNC (Scalabrino et al., 1999); (g) ripetute microiniezioni i.c.v. di EGF a ratti TGX riducono significativamente l'edema intramielino e quello interstiziale della sostanza bianca del midollo spinale (vedi Figura 5, riquadro E), senza tuttavia modificare il deficit di Cbl dei ratti TGX (Scalabrino et al., 2000); (h) ripetute microiniezioni i.c.v. di anticorpi specifici anti-EGF a ratti normali inducono nella sostanza bianca del midollo spinale entrambi i tipi di edema tipici della DSC (Scalabrino et al., 2000) (vedi Figura 5, riquadro I); (i) i livelli di IL-6 diminuiscono significativamente nel liquido cefalorachidiano dei ratti TGX e dei ratti alimentati con dieta priva di Cbl, ma ritornano normali in séguito alla somministrazione cronica postoperatoria di Cbl (Scalabrino et al., 2002). Pertanto, i danni neurologici causati dalla carenza cronica di Cbl nel SNC del ratto sono il risultato dello spostamento dell'equilibrio fisiologico nel SNC dei livelli di queste tre molecole a favore del TNF- α . È importante qui ricordare che anche nel siero e nel liquido cefalorachidiano dei pazienti carenti in Cbl è stato dimostrato un aumento dei livelli di TNF- α e una diminuzione di quelli di EGF (Peracchi et al., 2001; Scalabrino et al., 2004). Inoltre in questi pazienti la terapia con la Cbl normalizza i valori plasmatici sia di TNF- α sia di EGF (Peracchi et al., 2001). Quindi è possibile ipotizzare che la regolazione del complesso sistema di citochine e fattori di crescita da parte della Cbl non sia limitata al SNC, ma possa avvenire anche in altri organi e tessuti del corpo umano.

Come precedentemente ricordato, la mielina e le cellule gliali sono un bersaglio della carenza di Cbl sia nella DSC (Pant et al., 1968; Kunze et al., 1976; Harper and Butterworth, 2002) sia negli animali in carenza di Cbl, ad es. nel ratto TGX (Scalabrino, 2001). Abbiamo confermato che la DSC è una malattia mielinolitica pura (Powers, 1996), poiché nel SNC dei ratti carenti in Cbl non sono stati osservati segni morfologici di rimielinizzazione o di danno degli oligodendrociti (Tredici et al., 1998a). L'"attivazione" delle cellule gliali precedentemente dimostrata nei reperti autoptici di SNC di pazienti con DSC (Pant et al., 1968) come pure nel SNC dei pipistrelli carenti in Cbl (Metz et al., 1987), è stata confermata dai nostri studi (Scalabrino et al., 1995;

Tredici et al., 1998a). Nei ratti TGX abbiamo dimostrato un persistente e diffuso aumento dell'immunoreattività degli astrociti per la GFAP nella sostanza grigia del midollo spinale (*Scalabrino et al., 1995*) e una persistente attivazione delle cellule della microglia sia nella sostanza bianca sia nella sostanza grigia del midollo spinale (*Tredici et al., 1998a*). Infine, i livelli del mRNA per la GFAP diminuiscono significativamente nel midollo spinale e nell'ipotalamo, ma non nella corteccia, nell'ippocampo o nello striato dei ratti TGX (*Magnaghi et al., 2002*), permettendo di ipotizzare che l'azione neurotrofica della Cbl nel SNC del ratto possa essere zonale (*Magnaghi et al., 2002*). Il trattamento postoperatorio con Cbl ai ratti TGX riduce fortemente la mielinolisi, l'edema interstiziale nel SNC (vedi Figura 5, riquadro C), l'astrogliosi, la positività per la GFAP (*Scalabrino et al., 1995; Tredici et al., 1998a*) e riporta ai valori di controllo i livelli del mRNA per la GFAP (*Magnaghi et al., 2002*). Abbiamo però osservato che non ci sono cambiamenti dei livelli degli mRNA per la principale proteina della mielina (la proteina basica della mielina (MBP)) nel SNC dei ratti TGX (con la sola eccezione dell'ipotalamo), e dei livelli degli mRNA per la glicoproteina P₀ e la proteina della mielina del SNP, la P₂₂ (*Magnaghi et al., 2002*): questi risultati confermano la natura mielinolitica e non demielinizzante della DSC sperimentale. Abbiamo anche dimostrato che la Me-Cbl radioattiva (marcata con C¹⁴) viene captata *in vivo* quasi esclusivamente dalle cellule gliali e dalle fibre mieliniche della sostanza bianca nel midollo spinale del ratto (*Scalabrino et al., 1999*). Nel midollo spinale dei ratti TGX abbiamo anche dimostrato una diminuzione significativa nei livelli delle due subunità H e L della ferritina (una delle principali proteine contenenti il ferro e sintetizzata anche dagli oligodendrociti), senza tuttavia che si osservino modificazioni del contenuto di ferro del midollo spinale (*Cairo et al., 2002*). Possiamo quindi affermare che la carenza di Cbl colpisce soprattutto il metabolismo del ferro da un punto di vista funzionale. Infine l'ipotesi che la Cbl moduli la composizione del liquido cefalorachidiano, è stata recentemente avvalorata da nostri studi sul liquido cefalorachidiano dei ratti carenti in Cbl, in cui abbiamo dimostrato modificazioni qualitative e quantitative nel proteoma del liquido cefalorachidiano (*Gianazza et al., 2003*).

In conclusione, i nostri studi hanno ulteriormente dimostrato che la Cbl, analogamente a quanto dimostrato da altri autori per altre vitamine (*Brown et al., 1999; Tsaïoun, 1999*), modula l'espressione di alcuni geni nel SNC. La 1,25(OH)₂D₃ (il metabolita attivo della vitamina D₃) induce la sintesi di alcuni fattori neurotrofici nelle cellule gliali primarie in coltura (*Brown et al., 1999*), mentre la vitamina K regola l'espressione di *Gas 6*, un fattore neutrofico prodotto da un gene specifico dell'arresto della crescita cellulare (*Tsaïoun, 1999*). Tutti questi studi aprono senza dubbio nuove prospettive sulla modalità di azione di almeno tre vitamine (la vitamina B₁₂, la vitamina D₃ e la vitamina K) nel SNC dei mammiferi.

2. Le cause del deficit di vitamina B₁₂ nell'uomo

2.1. I difetti geneticamente determinati del trasporto e/o del metabolismo della Cbl o dei suoi coenzimi

Le patologie geneticamente determinate del trasporto e del metabolismo della Cbl mostrano fenotipi peculiari: ritardo nello sviluppo staturò-ponderale, sintomatologia neurologica e solo raramente anemia megaloblastica (Rosenblatt and Fenton, 2001). Queste patologie sono dovute a patologie geneticamente determinate della sintesi del coenzima Ado-Cbl o di quello Me-Cbl o di entrambi. Altre patologie geneticamente determinate che coinvolgono l'assorbimento intestinale della Cbl dipendono dalla mancata formazione o difettoso funzionamento del complesso FI-Cbl, o dalla mancanza o diminuzione dell'assorbimento del complesso FI-Cbl, o dall'impossibilità del trasporto della Cbl al di fuori dei lisosomi o infine dal difettoso rilascio della Cbl in circolo (Seetharam and Yammani, 2003). Le principali cause genetiche di carenza di Cbl sono riportate nella Tabella 3.

2.1.1. La deficienza di aptocorrina

La deficienza di aptocorrina è stata diagnosticata solo in un numero molto limitato di bambini e si presenta associata a deficienza di altre protei-

Cause genetiche	Cause acquisite
<ul style="list-style-type: none"> ● Deficienza di aptocorrina ● Anomalie del FI ● Anomalie nella formazione del complesso FI-Cbl ● Patologie dell'assorbimento intestinale ● Patologie del trasporto della Cbl ● Blocco della Cbl all'interno della cellula ileale ● Sindrome di Imerslund-Gräsbeck ● Patologie del rilascio della Cbl nel sangue ● Anomalie della sintesi dei coenzimi contenenti Cbl 	<ul style="list-style-type: none"> ● Carenze nutrizionali ● Gastrite (autoimmune o da <i>Helicobacter Pylori</i>) ● Tumori gastrici ● Gastrectomia totale o parziale ● Malattie intestinali (infestazione da <i>Diphyllobothrium latum</i>, la sindrome da ansa cieca, la sprue tropicale, ecc.) ● Insufficienze funzionali del pancreas esocrino ● Uso prolungato di N₂O in anestesia

Tabella 3. Principali cause di deficit di Cbl nell'uomo.

ne sintetizzate dai granulociti neutrofilici, come ad esempio la lattoferrina. Non è stata però identificata alcuna mutazione a livello del gene dell'aptocorrina responsabile di tale malattia. Inoltre, i pazienti con deficit sierico di aptocorrina presentano un basso livello sierico di Cbl, ma non mostrano alcuna sintomatologia di deficienza vitaminica (Lin *et al.*, 2001; Rosenblatt and Fenton, 2001; Seetharam and Yammani, 2003).

2.1.2. Il malassorbimento della Cbl dovuto ad una difettosa formazione del complesso FI-Cbl o ad una difettosa struttura del FI

La mancata formazione del complesso FI-Cbl o il suo mancato funzionamento sono la conseguenza dell'inadeguata dissociazione della Cbl dalle proteine alimentari, di un ridotto trasferimento della Cbl dalle proteine R al FI, della mancata sintesi del FI, e della sintesi di un FI anomalo (Rasmussen *et al.*, 2001). Il ridotto passaggio della Cbl dalle proteine R al FI può essere dovuto ad insufficiente secrezione di proteasi pancreatiche o alla loro inattivazione. Il FI può non funzionare a causa di mutazioni a livello del sito del suo legame con la Cbl, oppure a livello del sito di legame con la CUB, oppure a livello dei siti dell'azione degli enzimi proteolitici, diventando così più sensibile all'azione di quest'ultimi. In questo tipo di malattie la funzionalità e la morfologia delle cellule gastriche sono normali.

2.1.3. La sindrome di Imerslund-Gräsbeck (ovvero l'anemia megaloblastica di tipo 1 (MGA1))

Nei bambini con la sindrome di Imerslund-Gräsbeck (una malattia autosomica recessiva, anche denominata MGA1) è presente un malassorbimento degli enterociti selettivo per la Cbl (Carmel *et al.*, 2003a). Questi pazienti presentano anemia megaloblastica e raramente deficit neurologici. Il malassorbimento della Cbl in questi pazienti è dovuto ad un mancato assorbimento del complesso FI-Cbl o ad un suo ridotto assorbimento dovuto alla presenza di mutazioni nel gene CUB: ciò provoca consistenti diminuzioni dell'affinità del legame tra CUB ed il complesso FI-Cbl (Seetharam and Yammani, 2003). Esistono però più fenotipi della sindrome di Imerslund-Gräsbeck, dovuti a diversi tipi di mutazioni non solo a livello del gene CUB ma anche in altri geni accessori, come ad esempio quello della MG o quello dell'"amniotico"* (AML) (Tanner *et al.*, 2003).

In studi condotti su popolazioni finniche sono stati evidenziati due tipi di mutazioni nel gene della CUB. Una (comunemente denominata FM1) comporta la sostituzione della prolina (residuo in posizione 1297) con una leucina ed avviene a livello del dominio 8 della CUB coinvolgendo il sito di legame con il complesso FI-Cbl. L'altra mutazione (comunemente denominata FM2) riguarda un singolo nucleotide e provoca la formazione di "codoni di stop"*** multipli nel dominio 6 della CUB. Mentre i pazienti con la muta-

zione FM1 hanno una CUB con una diminuita affinità per il complesso FI-Cbl, quelli con la mutazione FM2 hanno un recettore tronco che non raggiunge l'apice degli enterociti, condizione necessaria per l'assorbimento della Cbl (Aminoff et al., 1999; Kristiansen et al., 2000).

Talvolta il malassorbimento della Cbl è invece dovuto ad una ritenzione della Cbl all'interno della cellula ileale: ciò avviene a séguito della mancata fuoriuscita della Cbl dai lisosomi (Rosenblatt et al., 1985). Questa rara malattia dimostra l'importanza dei lisosomi nel trasporto della Cbl all'interno della cellula ileale e viene spesso classificata come una delle forme della sindrome di Imerslund-Gräsbeck, in quanto coinvolge l'assorbimento della Cbl dopo la formazione del complesso FI-Cbl e prima del trasferimento alla TCII (Seetharam and Yammani, 2003).

(*Amnionless: indica l'assenza dell'amnios. Il primo prodotto genico dell'AML ad essere scoperto è stato una proteina transmembrana espressa durante la gastrulazione sul foglietto viscerale extraembrionico. La mutazione di questa proteina determina la mancata formazione dell'amnio (da qui il nome) e del foglietto mesodermico. Successivamente sono stati identificati altri prodotti proteici del gene AML tra cui una proteina coinvolta nell'assorbimento della Cbl (Kalantry et al., 2001)).

(**Codone: è una sequenza di tre nucleotidi continui codificante per un aminoacido. **Codone di stop: codone non associato ad alcun aminoacido che segnala la fine della "traduzione" di un mRNA e il rilascio del polipeptide).

2.1.4. Patologie della TCII

Queste malattie sono dovute alla mancata sintesi della TCII o alla produzione di TCII non funzionalmente utile e quindi non in grado di legarsi alla Cbl. Entrambe le malattie sono autosomiche ereditarie (Seetharam and Yammani, 2003). Nella popolazione bianca, il polimorfismo più frequente nel gene della TCII è la sostituzione della guanina con la citosina in posizione 775 (775G>C), il che provoca la sostituzione della prolina con l'arginina al codone 259. Nei soggetti omozigoti per la presenza dell'arginina nella proteina della TCII i livelli sierici di MMA sono più alti di quelli in soggetti con altro genotipo (Miller et al., 2002).

2.1.5. Le patologie della sintesi dei coenzimi contenenti Cbl

Le anomalie geneticamente determinate della sintesi dei coenzimi contenenti la Cbl causano alcune malattie del metabolismo della Cbl. I pazienti che presentano queste malattie sono divisi in sette tipi denominati: *CblA*, *CblB*, *CblC*, *CblD*, *CblE*, *CblF*, *CblG*, ognuno dei quali è a trasmissione autosomica recessiva. Le malattie "*CblA*" e "*CblB*" sono dovute ad una diminuzione della sintesi della Ado-Cbl, ma accompagnate da una normale sintesi della Me-

Cbl, e quindi da alti livelli sierici di MMA (con conseguentemente aciduria metilmalonica). Nei pazienti con le malattie "CblA" e "CblB" è stata dimostrata mediante un'analisi di complementazione genetica la presenza di due lesioni in due loci geneticamente distinti. Studi *in vitro* su cellule di pazienti con "CblA" hanno dimostrato che esse sono incapaci di convertire la OH-Cbl in Ado-Cbl, mentre sono in grado di produrre Me-Cbl. Tali cellule presentano, infatti, un'anomalia in una Cbl-riduttasi mitocondriale che interviene a livello delle prime tappe del metabolismo mitocondriale della Cbl (Watkins *et al.*, 2000). I fibroblasti dei pazienti con patologia "CblB" presentano invece anomalie a livello dell'enzima cob(I)alamina adenosiltrasferasi (E.C. 2.5.1.17) (Rosenblatt and Fenton, 2001). I pazienti con patologia "CblE" e "CblG" hanno una diminuita sintesi di Me-Cbl e una normale sintesi di Ado-Cbl, con conseguente deficit dell'attività della metionina sintetasi. L'analisi di complementazione genetica basata sull'incorporazione di N⁵-metilFH₄ ha permesso di distinguere i due gruppi di complementazione di pazienti con malattia "CblE" o con malattia "CblG". I pazienti con malattia "CblE" presentano una serie di mutazioni nel gene che codifica per l'enzima metionina-sintetasi-riduttasi (E.C. 4.2.99.10) che è necessario per la riduzione della Cbl a cob(I)alamina, e pertanto permette il legame della Cbl stessa alla metionina sintetasi (Leclerc *et al.*, 1999). I pazienti con la malattia "CblG" hanno invece anomalie a livello della subunità catalitica della metionina sintetasi (Chen *et al.*, 1997). I pazienti con le malattie "CblC" o "CblD" o "CblF" presentano una diminuita sintesi di entrambi i coenzimi della Cbl, con conseguente aciduria metilmalonica e omocisteinuria. Le cellule dei pazienti con patologia "CblC" (e in misura minore quelle dei pazienti con patologia "CblD") presentano anomalie nell'enzima citosolico cob(III)alamina-riduttasi (E.C. 1.6.99.9), che riduce il Co⁺⁺⁺ della Cbl prima della formazione della Me-Cbl. Nelle patologie "CblC" e "CblD" è stata anche descritta una deficienza parziale della cob(III)alamina-riduttasi microsomiale (Rosenblatt and Fenton, 2001). Nelle cellule dei pazienti con deficit "CblF" si osserva invece un difetto nella fuoriuscita della Cbl dai lisosomi, dopo essere stata endocitata dalla cellula (Rosenblatt and Fenton, 2001).

2.2. Le malattie che causano una carenza acquisita di vitamina B₁₂ nell'adulto

L'AP è la causa più comune della carenza acquisita della Cbl. Essa è una malattia a patologia autoimmune verso le cellule parietali del corpo e del fundus dello stomaco, anche se nel sangue dei pazienti si possono riscontrare anche autoanticorpi contro la pompa protonica delle cellule e/o contro il FI stesso. La ovvia conseguenza di ciò è la ridotta produzione o inattivazio-

ne del FI. La reazione autoimmune è mediata dai linfociti T del tipo CD8⁺. L'autoimmunizzazione contro le cellule parietali causa una gastrite cronica di tipo atrofico (di tipo A) e riduce grandemente anche la produzione di acido cloridrico (acloridia). Anche la gastrite da *Helicobacter Pylori* (gastrite atrofica di tipo B) è una malattia in cui si riduce il numero delle cellule parietali dello stomaco che producono il FI (King et al. 1979; Suter et al. 1991). La GT (ma in certi casi anche quella parziale) implicano la totale o parziale perdita della sintesi di FI e, in ultima analisi, una carenza di Cbl nell'organismo (Tovey et al., 1990; Adachi et al., 2000).

Anche nel 50-70% dei pazienti con insufficienza funzionale del pancreas esocrino in séguito a pancreatiti croniche o a pancreatectomia è stato dimostrato un malassorbimento della Cbl (Allen et al., 1978). Studi clinici condotti su questi pazienti hanno dimostrato che il cattivo assorbimento della Cbl è dovuto alla carenza di proteasi pancreatiche che a sua volta impedisce la scissione della Cbl dalla proteina R. La Cbl nel duodeno normale è unita esclusivamente al FI, mentre nel duodeno di pazienti con insufficienza pancreatica il 65% della vitamina è unita alla proteina R, venendosi così a formare un complesso non riconoscibile dai recettori degli enterociti ileali (Allen et al., 1978).

Anche alcune malattie intestinali, quali l'infestazione da *Diphyllobothrium latum*, la sindrome dell'ansa cieca (in cui parassiti e/o i batteri competono con l'organismo ospite per l'utilizzazione della Cbl (Schjonsby, 1972, 1973)), la sprue tropicale (Backer et al., 1970; Klipstein, 1970), la malattia celiaca e il morbo di Crohn sono altre cause di malassorbimento della Cbl.

La carenza di Cbl può essere dovuta ad un'insufficiente introduzione della vitamina con l'alimentazione (diete strettamente vegetariane, cioè il veganismo) o a varie malattie dei vari organi coinvolti nel suo assorbimento (Seetharam, 1994).

L'uso prolungato dell'ossido nitroso (N₂O), utilizzato come anestetico in odontoiatria, può causare uno stato carenziale di Cbl in quanto esso impedisce la riduzione della Cbl(II) (divalente) a Cbl(I) (monovalente): la Cbl così inattivata non può essere utilizzata nelle resintesi dei coenzimi Cbl-dipendenti (Antony, 2000). Le principali malattie che comportano una carenza acquisita di Cbl sono riportate nella Tabella 3.

2.3. La carenza acquisita di Cbl in età pediatrica

Le cause della carenza acquisita di Cbl in età pediatrica sono rappresentate da carenze nutrizionali (ad es. nutrizione con latte da madri carenti in Cbl). Occorre quindi diagnosticare per tempo uno stato di carenza di Cbl della madre (Rasmussen et al., 2001).

3. Cenni sulle principali manifestazioni cliniche delle malattie genetiche del trasporto e del metabolismo della Cbl e della sintesi dei suoi coenzimi

Le patologie geneticamente determinate del trasporto e del metabolismo della Cbl si manifestano con una sintomatologia neurologica differente da quella delle malattie da carenza acquisita di Cbl nell'adulto e in relazione al tipo di patologia interessata (cioè, del trasporto della Cbl o del suo recettore o della sua funzione coenzimatica) (*Rosenblatt and Fenton, 2001*).

3.1. Le malattie del trasporto della Cbl

Sono stati diagnosticati alcuni bambini con patologia dovuta a deficit geneticamente determinato del FI e chiamata IIFD (Inherited Intrinsic Factor Deficiency) dovuta a delezione di parte del gene per il FI (*Yassin et al., 2004*) oppure alla presenza di una sequenza aberrante del gene per il FI che tuttavia non si associa a un fenotipo IIFD (*Gordon et al., 2004*). Il midollo osseo dei pazienti del primo tipo mostra il caratteristico aspetto megaloblastico (*Rosenblatt and Fenton, 2001*). Sono stati anche identificati bambini con un FI normale ma con malassorbimento della Cbl dovuto a mutazioni a livello del gene CUB o AML o MG (*Rosenblatt and Fenton, 2001; Tanner et al., 2003*). Questi pazienti presentano tutti la sintomatologia analoga a quella della sindrome di Imerslund-Gräsbeck, consistente in anemia megaloblastica giovanile (MGA1) e proteinuria. A differenza dei pazienti con anomalie a livello di FI, il normale assorbimento intestinale della Cbl non è ripristinato dalla somministrazione di succo gastrico normale (*Rosenblatt and Fenton, 2001*).

Sono stati infine riscontrati casi di bambini con deficit di TCII, che si manifesta principalmente con ritardo nella crescita staturò-ponderale, anemia megaloblastica, immunodeficienza e disturbi neurologici (*Rosenblatt and Fenton, 2001*). La sintomatologia neurologica si manifesta più tardivamente e in forma più lieve nei bambini con deficit geneticamente determinato del FI, della CUB o dell'AML o della MG. Questa differenza della comparsa temporale delle due patologie può essere attribuita al fatto che il meccanismo dell'assorbimento intestinale della Cbl cambia dal tipo pinocitico a quello recettoriale solo dopo il primo anno di vita: la presenza della TCII è invece sem-

pre indispensabile sin dai primi giorni di vita per permettere l'entrata della Cbl nella cellula (*Rosenblatt and Fenton, 2001*).

Va ricordato che nelle patologie geneticamente determinate della Cbl nei loro vari aspetti l'anemia megaloblastica è connessa principalmente alle patologie del trasporto della Cbl, mentre essa non è riscontrabile nelle patologie da alterato metabolismo della Cbl. Le anomalie biochimiche conseguenti al carente funzionamento degli enzimi Cbl-dipendenti (cioè l'ipermetilmalonacidemia e l'iperomocisteinemia) vengono riscontrate in qualsiasi patologia geneticamente determinata e non, che comporti una carenza in Cbl. Occorre qui ricordare però che le quantità di MMA e di OMOCIS escrete con le urine sono di norma più basse nei pazienti con patologie del trasporto della Cbl rispetto a quelle escrete dai pazienti con patologie del suo metabolismo (*Rosenblatt and Fenton, 2001*). Infatti il rene svolge in condizioni normali un ruolo molto importante nella regolazione della quantità escreta di MMA e di OMOCIS.

3.2. Le malattie del metabolismo della Cbl

L'iperomocisteinemia e l'ipermetilmalonicoacidemia, entrambe dovute all'insufficiente funzionamento dei coenzimi contenenti la Cbl, sono molto più marcate nelle malattie dovute a difetti del metabolismo cellulare della Cbl rispetto a quelle dovute a deficit del trasporto della Cbl. I pazienti con patologia "CblA" o "CblB" presentano sintomatologie molto simili sia tra loro e sia a quelle dei pazienti con difetto genetico della MMCoA-mutasi: letargia, ritardo nella crescita staturò-ponderale, vomito ricorrente e ipotonia muscolare. Significativamente l'anemia megaloblastica, caratteristica delle malattie del trasporto della Cbl e/o delle malattie genetiche della sintesi della MeCbl (cioè i pazienti con le patologie "CblC", "CblD", "CblE", "CblF" o "CblG"), non è presente nei pazienti con patologia "CblA" o "CblB" (*Rosenblatt and Fenton, 2001*).

I pazienti con patologia "CblE" o "CblG" sono sintomatologicamente molto simili tra loro sia dal punto di vista clinico sia da quello delle conseguenze biochimiche in essi presenti: vomito, ritardo nello sviluppo staturò-ponderale, letargia e una grave sintomatologia neurologica dovuta a atrofia cerebrale. In entrambe queste malattie i sintomi neurologici sono quelli preponderanti (*Rosenblatt and Fenton, 2001*).

Nei bambini con patologie geneticamente determinate della Cbl le manifestazioni neurologiche differiscono generalmente da quelle della DSC. Infatti in questi bambini i danni neurologici sono di norma limitati all'encefalo e consistenti nella perdita di sostanza bianca e ritardo nella mielinizzazione (*Enns et al., 1999*); mediante la risonanza magnetica nucleare (RMN) si

riscontrano infatti diffusi rigonfiamenti della sostanza bianca sovratentoriale, ritardo nella mielinizzazione e atrofia corticale (Rosenblatt et al., 1997).

Sia l'indagine mediante RMN del SNC dei bambini con patologia "CbIC" sia i reperti autoptici dei pochissimi casi di bambini deceduti per patologia "CbIC" hanno rivelato invece che questa malattia genetica è l'unica, tra quelle geneticamente determinate del trasporto e del metabolismo della Cbl, che presenti un quadro neuropatologico simile a quello della DSC. Nella patologia "CbIC" le manifestazioni neurologiche sono le principali, mentre solo in alcuni pazienti sono presenti anemia megaloblastica (Rosenblatt and Fenton, 2001). Invece la sintomatologia clinica dei pazienti con patologia "CbID" appare essere meno grave rispetto a quella dei pazienti con patologia "CbIC" (Rosenblatt and Fenton, 2001). Nei pazienti con patologia "CbIF" la sintomatologia consiste essenzialmente in un ritardo nello sviluppo psico-somatico, mentre solo alcuni di essi presentano macrocitosi, ipersegmentazione dei granulociti polimorfonucleati, neutropenia o trombocitopenia (Rosenblatt and Fenton, 2001).

4. Principali manifestazioni cliniche delle malattie da carenza acquisita di vitamina B₁₂ nell'età adulta (cioè le cosiddette anemie perniciose e perniciosiformi)

I termini "Anemia Perniciosa" sono spesso usati per indicare una situazione acquisita di carenza di Cbl nell'adulto, ma in realtà essi dovrebbero essere attribuiti solo alla condizione patologica in cui un'alterazione della mucosa gastrica produce un'insufficiente produzione o funzione del FI che impedisce o riduce significativamente l'assorbimento della Cbl. Tradizionalmente, l'AP rientra nel gruppo più ampio delle anemie megaloblastiche (Allen, 1996).

L'AP è caratterizzata da difetti nella sintesi del DNA delle cellule dell'apparato digerente e del midollo osseo (segnatamente delle cellule della serie eritropoietica) (Allen, 1996; Antony, 2000).

Qui vengono esposti solo alcuni cenni sulle manifestazioni cliniche, rimandando i lettori ai principali trattati italiani e/o anglosassoni di ematologia, neurologia e gastroenterologia per ulteriori approfondimenti.

4.1. Le principali manifestazioni ematologiche

Gli aspetti ematologici classici della deficienza di Cbl nell'adulto sono l'anemia ipercromica, l'aumento del volume corpuscolare medio e, in fase più avanzata, la trombocitopenia e la neutropenia. La caratteristica biochimica degli eritroblasti anomali chiamati megaloblasti è la difettosa sintesi del DNA. Nel ciclo cellulare normale delle cellule eucariotiche la fase G₁ è seguita dalla fase di sintesi (fase S) del DNA, dalla fase G₂, dalla mitosi e dalla citocinesi. Nel ciclo cellulare normale la maggior parte delle cellule è in fase G₁ e presenta quindi una quantità di DNA pari a 2N (dove N è la quantità di DNA nel genoma aploide), mentre solo alcune cellule (in fase S, G₂ e prima della divisione mitotica) hanno una quantità pari a 4N. Invece nei pazienti affetti da anemia megaloblastica la maggior parte delle cellule "labili" secondo la classificazione di Bizzozzero (cioè i megaloblasti, gli enterociti e le cellule della mucosa gastrica) durante la loro duplicazione si caratterizza per un raddoppiato patrimonio di DNA (4N) in fase S, nella quale queste cellule si arrestano. I nuclei dei megaloblasti sono più larghi di quelli dei normoblasti

(vedi Figura 7, riquadri A e B) e la cromatina si presenta dispersa in maniera anomala a causa di una condensazione ritardata. Anomalie cromosomiche come un eccessivo allungamento dei cromosomi e/o rotture casuali ed eccessive costrizioni a livello dei centrioli possono essere presenti nei megaloblasti. Gli eritrociti maturi derivati dai megaloblasti presentando un volume maggiore del normale sono detti macrociti (*Carmel, 2004*). Man mano che lo stato anemico si aggrava, la poichilocitosi dei macrociti diviene più pronunciata con presenza di cellule a forma di lacrima (*Kass, 1976*). Inoltre si può

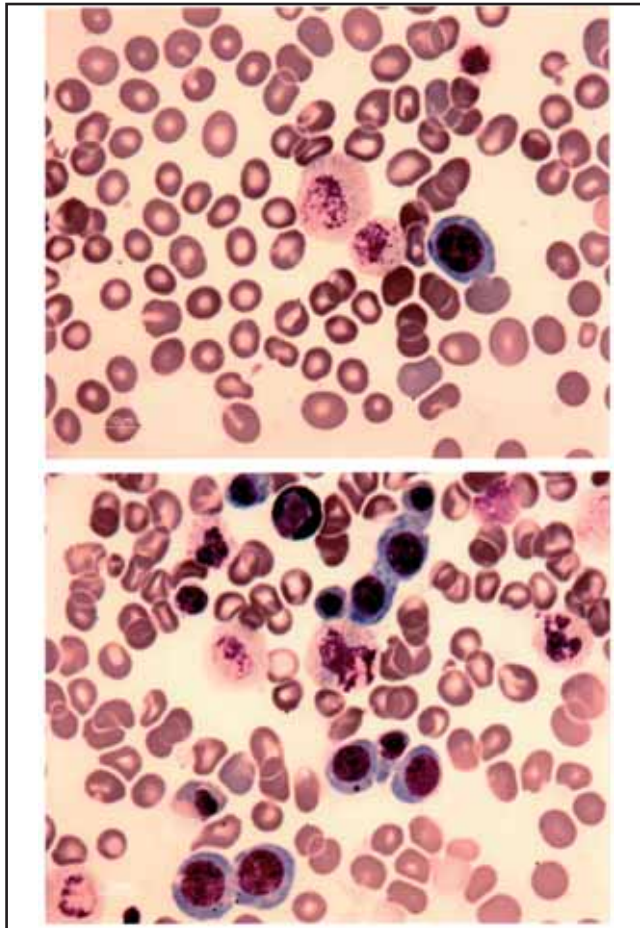


Figura 7. Microfotografia di aspirato midollare ottenuto da un paziente affetto da anemia perniziosa. E' possibile osservare alcuni megaloblasti in differente stadio maturativo. Colorazione: May-Grünwald-Giemsa. (Dalla istoteca del Prof. Rosario Scalabrino).

osservare un aumento sia dell'eritropoiesi inefficace dovuto ad un'eccessiva fagocitosi dei megaloblasti, sia dell'emolisi intravascolare con una diminuzione del 30-50% della durata di vita dei megalociti. Quest'ultima anomalia è responsabile della breve sopravvivenza degli eritrociti trasfusi ai pazienti con AP (Babior, 2001). Si formano dei metamielociti giganti con larghi nuclei di forma anomala e con citoplasma contenente sia granuli eosinofili che granuli basofili (Kass, 1976). I neutrofilii polimorfonucleati maturi si presentano invece con nucleo lobato a restrizioni localizzate e con ipersegmentazione nucleare (Carmel, 2004).

4.2. Le principali manifestazioni neurologiche

La carenza di Cbl causa anche una varietà di sintomi neuropsichiatrici, riassunti nella Tabella 4. Il termine DSC definisce la neuropatia da carenza di Cbl frequentemente associata all'AP: essa colpisce sia le colonne posteriori del midollo spinale sia i nervi periferici. La durata delle manifestazioni neurologiche è più lunga nei pazienti non anemici (Healton et al., 1991). Di solito la gravità delle manifestazioni neurologiche aumenta con l'aggravarsi delle manifestazioni ematologiche (Healton et al., 1991; Savage and Lindenbaum, 1995). La sintomatologia della DSC è costituita da disturbi della sensibilità profonda, parestesie agli arti, disordini della deambulazione che in rari casi possono arrivare alla atassia spastica, deficit cognitivo e la demenza. La DSC nella sua manifestazione nel SNC è caratterizzata da demielinizzazione della sostanza bianca del tratto corticospinale e delle colonne posteriori del midollo spinale. Al microscopio ottico numerosi vacuoli nella sostanza bianca del midollo spinale sostituiscono le guaine mieliniche: ne risulta che la sostanza bianca del midollo spinale acquista un aspetto spongiforme. L'edema intramielinico e quello interstiziale stanno alla base della diffusa vacuolizzazione riscontrabile al microscopio ottico (Tredici et al., 1998a) (Figura 4, riquadri da A a C, e Figura 8). La sostanza bianca dell'encefalo può essere colpita, anche se più raramente (come ad esempio nella leucoencefalopatia associata a defi-

<ul style="list-style-type: none">● Anosmia● Atassia● Perdita del gusto● Perdita della memoria● Parestesie● Delirio● Psicosi paranoiche

Tabella 4. Principali manifestazioni neurologiche e psichiatriche della DSC.

cit di Cbl (Chatterjee et al, 1996; Heckman et al. 2003). Non sono mai stati osservati aspetti morfologici di rimielinizzazione (Pant et al., 1968; Kunze et al., 1976). Infine, un'altra manifestazione caratteristica della DSC è la polineuropatia che coinvolge in particolare i nervi sensitivi. Non è ancora chiaro se la polineuropatia sia una manifestazione distinta o secondaria alla neuropatia centrale (Sapertein et al., 2003). Anche alcuni dati dimostrano che nella DSC sperimentale il SNP viene colpito in concomitanza con il SNC piuttosto che come conseguenza del danno a quest'ultimo (Tredici et al., 1998b).

Una tipica caratteristica neuropatologica della DSC è l'astrogliosi, mentre gli oligodendrociti e i neuroni sembrano normali (Pant et al., 1968; Kunze et al., 1976). Non è mai stato osservato nelle autopsie del SNC di pazienti morti per AP alcun segno istopatologico di infiammazione (Pant et al., 1968; Kunze et al., 1976). La DSC pertanto non può essere considerata una vera malattia neurodegenerativa, perché etimologicamente il sostantivo "neuro-

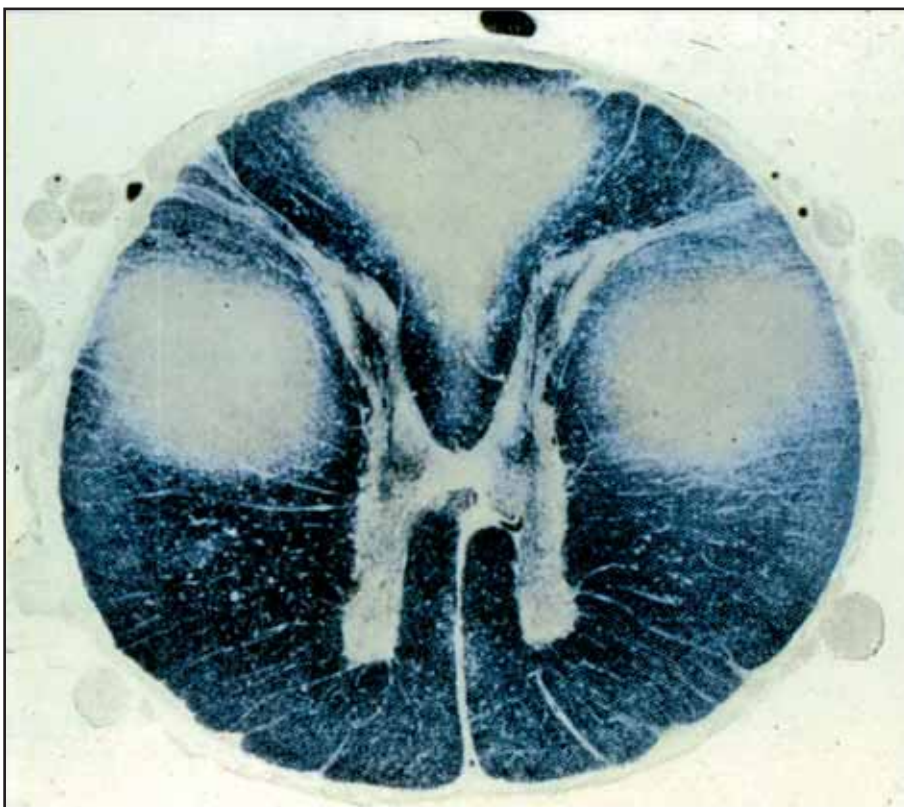


Figura 8. Sezione coronale di midollo spinale con DSC, ottenuto da autopsia di un paziente con AP (ingrandimento: 10X).

degenerazione” si riferisce a condizioni patologiche che colpiscono principalmente i neuroni o specifici gruppi neuronali (*Przedborski et al., 2003*). L'edema della sostanza bianca può essere rilevato mediante la RMN (*Bassi et al., 1999*) e può essere considerato in parte responsabile delle variazioni funzionali dei tests elettrofisiologici dei potenziali evocati (*Fine et al., 1990*).

4.3. Le principali manifestazioni a carico dell'apparato digerente

La carenza acquisita di Cbl nell'adulto causa numerose anomalie dell'apparato digerente. La lingua diventa liscia, turgida e rossa a causa di una glossite atrofica. All'esame endoscopico dello stomaco si osservano una perdita delle pieghe della mucosa e un suo assottigliamento. La gastrite atrofica può essere classificata in: gastrite di tipo A (autoimmune), in cui le lesioni colpiscono il fundus e il corpo dello stomaco, e gastrite di tipo B (non-autoimmune) in cui le lesioni colpiscono l'antro dello stomaco oltre al fundus e al corpo. Biopsie dello stomaco di pazienti con AP mostrano una costante infiltrazione di linfociti e plasmacellule nella mucosa, accompagnata da degenerazione delle cellule parietali. Nelle gastriti sopra ricordate il numero delle ghiandole gastriche e quello delle cellule parietali si riducono, mentre le cellule che producono zimogeno scompaiono e sono sostituite da cellule che contengono muco (la cosiddetta metaplasia intestinale). Dall'1% al 3% dei pazienti con AP sviluppano nel tempo un carcinoma gastrico e viceversa il 2% dei pazienti con carcinoma gastrico sviluppano l'AP.

4.4. Le principali manifestazioni immunologiche

E' dimostrato da studi *in vitro* che la Me-Cbl blocca la produzione delle principali citochine da parte dei linfociti T (*Yamashiki et al., 1992*). In particolare essa agisce sulla sintesi dell'IL-6, dell'interferone- γ e dell'IL-1 β che sono citochine coinvolte in molte malattie immuno-mediate (*Yamashiki et al., 1992*). Anche la duplicazione dei linfociti e delle cellule NK è condizionata dalla disponibilità di Cbl. Infatti, nei pazienti con AP o perniciosiforme è stata dimostrata una linfocitopenia e una diminuita attività delle cellule NK, con un aumento del rapporto tra linfociti T helper (CD4) e linfociti T citotossici (CD8) (*Tamura et al., 1999*). Tutti questi parametri sono riportati ai valori di controllo dopo trattamento dei pazienti con Me-Cbl. Nelle forme più gravi di AP i linfociti e i monociti appaiono più grandi del normale; i soli monociti presentano il nucleo plurilobato (*Kass, 1976*). Il livello di immunoglobuline non sembra invece essere influenzato dai livelli di Cbl (*Tamura et al., 1999*).

5. Patogenesi delle principali manifestazioni biochimiche e della sintomatologia clinica da carenza di vitamina B₁₂

5.1. La patogenesi della sintomatologia delle malattie geneticamente determinate

Nelle patologie genetiche del trasporto e del metabolismo della Cbl si evidenzia una diminuzione dei livelli endocellulari di Ado-Cbl e/o della Me-Cbl con conseguente diminuita attività rispettivamente della MMCoA-mutasi e della metionina-sintetasi. Ciò comporta l'accumulo di OMOCIS e MMA nei tessuti e nei liquidi fisiologici. Le anomalie dello sviluppo del SNC sembrano essere dovute in parte a difetti della sintesi della mielina e alla diminuita attività della metionina-sintetasi. Le ipotesi formulate fanno riferimento alla neurotossicità dell'aumentato livello di OMOCIS nei tessuti e nel sangue, alla ridotta metilazione (causata da una ridotta sintesi di SAM) delle proteine, dei neurotrasmettitori e del DNA o infine alla cosiddetta "trappola" del N⁵-metilFH₄ (Rosenblatt and Fenton, 2001) precedentemente proposta per spiegare le anomalie ematologiche e neurologiche dell'AP (Das and Herbert, 1989). Quest'ultima consiste nel fatto che, a causa della mancata attività della metionina-sintetasi, si ha un accumulo "trappola" di N⁵-metilFH₄ che non può essere riconvertito a FH₄ ed essere quindi coinvolto nei processi di metilazione e di sintesi del DNA. Nonostante le ipotesi formulate, la patogenesi della sintomatologia delle malattie geneticamente determinate è ancora oscura.

5.2. La patogenesi dei principali danni da carenza acquisita di vitamina B₁₂

Nel passato le ipotesi formulate per spiegare la patogenesi della sintomatologia della DSC erano puramente biochimiche (Surtees, 1993; Weir and Scott, 1995) e facevano riferimento: (a) ad una diminuita attività della L-MMCoA-mutasi che causerebbe la sintesi di acidi grassi anomali con un conseguente danno alla struttura della mielina (Beck, 1991; Wickramasinghe, 1999); (b) ad una ridotta attività della metionina-sintetasi che causerebbe un diminuito apporto di SAM con conseguente danno alle metilazioni nel SNC

(Bottiglieri, 1996; Wickramasinghe, 1999; Molloy and Weir, 2001; Briddon, 2003); (c) ad una neurotossicità dell'aumento della OMOCIS a séguito della eccessiva stimolazione dei recettori N-metil-D-aspartato da parte di tale amminoacido (Lipton et al., 1997); (d) ad un'aumentata concentrazione di analoghi della Cbl nel sangue dei pazienti Cbl-deficienti (Allen et al., 1978; Carmel et al., 1988). Recentemente, i livelli di SAM e di cisteina nel siero di pazienti con AP con sintomi neurologici sono stati trovati essere più alti rispetto ai livelli dei pazienti con AP senza sintomatologia neurologica (Carmel et al., 2003b). È stata data molta importanza all'ipotesi che la riduzione dell'attività della metionina-sintetasi dovuta alla carenza di Cbl potesse essere l'aspetto chiave della patogenesi della DSC. Questa ipotesi è basata sul fatto che la carenza di Cbl causa un accumulo di OMOCIS e di S-Adenosil-OMOCIS con conseguente diminuzione del rapporto SAM/S-Adenosil-OMOCIS e conseguente drastica riduzione delle reazioni di metilazione. I principali dati che supportano questa ipotesi sono: (a) l'aggiunta *in vitro* di metionina è efficace come la Cbl nel correggere la difettosa sintesi del DNA nelle cellule del midollo osseo di pazienti carenti in Cbl (Sourial et al., 1985); (b) nel liquido cefalorachidiano dei pazienti con DSC la concentrazione di SAM è più bassa dei controlli, mentre quella di OMOCIS è più alta (Bottiglieri, 1996); (c) l'aggiunta di metionina alla dieta di scimmie esposte ad N₂O migliorava significativamente le lesioni del SNC simili a quelle della DSC (Scott et al., 1981).

I nostri studi volti a chiarire la patogenesi della DSC si sono focalizzati sul ruolo di alcuni fattori di crescita e di alcune citochine, in particolare sul ruolo del TNF- α e dell'EGF. Il TNF- α è coinvolto nella patogenesi di alcune malattie neurologiche umane (ad es. la sclerosi multipla) e sperimentali (ad es.: l'encefalomielite autoimmune murina (Benveniste, 1997) e la malattia di Creutzfeldt-Jakob del topo (Kordek et al., 1996)) caratterizzate soprattutto da vacuolizzazione o da demielinizzazione (Brosnan et al., 1995; Selmaj and Raine, 1995; Vitkovic et al., 2000). L'EGF è conosciuto come un regolatore della proliferazione e/o del differenziamento delle cellule gliali e del differenziamento dei neuroni (Yamada et al., 1997; Weisenhorn et al., 1999). Infine, l'IL-6 è coinvolta nella patogenesi di alcune malattie umane e sperimentali del SNC, come la malattia di Alzheimer (Blum-Degen et al., 1995), il morbo di Parkinson (Blum-Degen et al., 1995; Müller et al., 1998) e la sclerosi laterale amiotrofica (Sekizawa et al., 1998). Utilizzando il ratto TGX (per maggiori dettagli vedi il capitolo 1.5.), abbiamo dimostrato che il punto chiave della patogenesi della neuropatia centrale da carenza di Cbl è uno squilibrio nella sintesi di alcuni fattori di crescita e/o citochine e non l'allontanamento della vitamina in sé. Infatti la carenza di Cbl nel SNC del ratto provoca un'aumentata sintesi locale di un fattore neurotossico, il TNF- α , e la contemporanea diminuita sintesi locale di due agenti neurotrofici, l'EGF e l'IL-6. E' stato quindi dimostrato che la carenza cronica di Cbl nel SNC del ratto porta ad uno spostamento dell'equilibrio fisiologico in favore della neurotossicità da TNF- α (Buccellato et al.,

1999) rispetto ai due agenti neurotrofici, l'EGF (Scalabrino et al., 1999) e l'IL-6 (Scalabrino et al., 2002) (Figura 9). Ricerche cliniche condotte sul sangue e sul liquido cefalorachidiano di pazienti con deficit grave di Cbl (Peracchi et al., 2001; Scalabrino et al., 2004) sono in perfetto accordo con questi dati sperimentali. Occorre ricordare che è stato dimostrato che uno squilibrio nella produzione di un'ampia gamma di citochine è coinvolto anche nella patogenesi della sclerosi multipla e del suo modello sperimentale, l'encefalomielite autoimmune murina (Muñoz-Fernández and Fresno, 1998; Chitnis and Houry, 2003).

Il meccanismo mediante cui la deficienza di Cbl produce i suoi effetti megaloblastici non è ancora noto. L'ipotesi più accreditata è che la deficienza di Cbl, causando una ridotta attività della metionina sintetasi, induca una carenza di N⁵,N¹⁰-metileneFH₄ all'interno della cellula (Das and Herbert, 1989). Tale carenza interrompe la conversione della deossiuridina monofosfato (dUMP) a deossitimidina monofosfato (dTMP) con un aumento del rapporto dUMP/dTMP. L'elevata presenza di deossiuridina trifosfato (dUTP) (derivata dalla dUMP per incorporazione di due gruppi fosfati) promuove un'erronea incorporazione di residui d'uridina nel DNA che sono riconosciuti ed eliminati (Das and Herbert, 1989; Antony, 2000). La mancanza di deossitimidina trifosfato (dTTP) impedisce però il riparo della rottura al filamento di DNA. Ripetute rotture al filamento di DNA portano a frammentazioni del DNA (Antony, 2000).

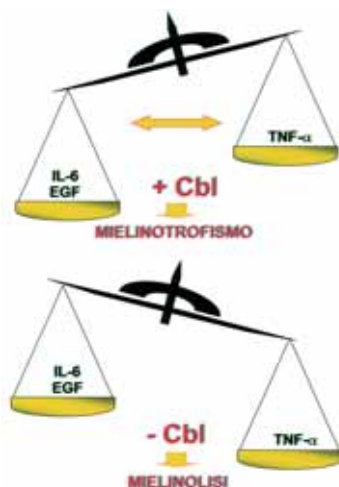


Figura 9. La Cbl regola l'equilibrio tra la produzione di EGF, IL-6 e TNF- α nel SNC del ratto. In alto: in presenza di Cbl la sintesi è in favore della produzione di EGF e di IL-6. In basso: in carenza di Cbl la sintesi è in favore del TNF- α .

6. Possibile coinvolgimento della vitamina B₁₂ nella patogenesi di alcune malattie neurologiche non classicamente collegate alla sua carenza

6.1. La sclerosi multipla

Già tra la fine degli anni '50 e l'inizio degli anni '60 del secolo scorso erano stati condotti numerosi studi sui livelli di Cbl nel siero e/o nel liquido cefalorachidiano di pazienti affetti da sclerosi multipla (per la relativa rassegna bibliografica, vedi *Reynolds et al., 1991*). A tutt'oggi i risultati riguardo al possibile ruolo della Cbl nella patogenesi della sclerosi multipla restano ancora contrastanti, nonostante siano applicati criteri più rigorosi per accertare uno stato carenziale di Cbl. E' ben noto che la sclerosi multipla è una malattia immuno-mediata caratterizzata da demielinizzazione, flogosi, danno assonale, e dalle cosiddette "placche demielinizzanti" (*Noseworthy et al., 2000*): nessuna di queste caratteristiche neuropatologiche è stata riscontrata nella DSC. Sebbene la maggioranza dei pazienti con sclerosi multipla non ha una chiara carenza di Cbl, è stato identificato un sottogruppo di pazienti che mostrano l'associazione delle due anomalie (*Reynolds, 1992a, b; Reynolds et al., 1992*). Per spiegare questo dato clinico si possono avanzare diverse ipotesi: (a) la sovrapposizione di queste due anomalie può essere solo una coincidenza; (b) i pazienti con sclerosi multipla erano già carenti in Cbl precedentemente alla diagnosi clinica della malattia; (c) i pazienti con sclerosi multipla e bassi livelli di Cbl rappresentano un sottogruppo di pazienti in cui la sclerosi multipla ha un decorso particolare; (d) la carenza di Cbl può peggiorare il decorso della sclerosi multipla; o, infine, (e) l'associazione delle due anomalie può essere una conseguenza della sclerosi multipla. Alcuni Autori hanno ipotizzato che la riduzione dei livelli di Cbl nel siero e nel liquido cefalorachidiano dei pazienti con sclerosi multipla potrebbe essere correlata a precedenti trattamenti con corticosteroidi (*Frequin et al., 1993*). Tuttavia, quando sono stati utilizzati tests biochimici (come i livelli di Cbl e i livelli di MMA e OMOCIS nei liquidi fisiologici) per accertare la carenza di Cbl, è emerso che i casi di sclerosi multipla con una carenza clinicamente grave di Cbl sono poco frequenti (*Goodkin et al., 1994*). Pertanto il livello di Cbl nel liquido cefalorachidiano non può ancora essere utilizzato come parametro diagnostico della sclerosi multipla (*Nijst et al., 1990*), anche se alcuni pazien-

ti con sclerosi multipla siano stati curati con la sola terapia con Cbl (*Reynolds et al., 1991*) o con la Cbl in combinazione con lofepramina e L-fenilalanina (*Loder et al., 2002*). In alcuni pazienti con sclerosi multipla inoltre è stato osservato un aumento dei livelli plasmatici di OMOCIS, senza tuttavia osservare un'opposta modificazione dei livelli sierici e/o liquorali di Cbl (*Vrethem et al., 2003*). Allo stato attuale delle conoscenze, la patogenesi della DSC e quella della sclerosi multipla sembrano avere in comune solo l'aumentata sintesi di TNF- α (*Sharief and Thompson, 1992; Buccellato et al., 1999*): l'aumentata sintesi di TNF- α nel SNC in queste due malattie induce a ritenere che un eccesso di questa citochina può causare danni mielinici, indipendentemente dal meccanismo che lo ha prodotto.

6.2. La malattia di Alzheimer

Le stesse considerazioni precedentemente fatte possono essere proposte riguardo ai bassi livelli di Cbl riscontrati in pazienti con la malattia di Alzheimer (*Hutto, 1997; Wang, 2002*), sebbene si debbano sottolineare alcune differenze tra le due malattie. Quasi tutti i dati sulla Cbl nei pazienti con la malattia di Alzheimer sono stati ottenuti sul siero (*Wang, 2002*) e non ci sono finora dati che dimostrano che la somministrazione di Cbl dia alcun beneficio ai pazienti stessi. Pertanto l'associazione tra i bassi livelli di Cbl e la malattia di Alzheimer necessita una meta-analisi (*Ikeda et al., 1990; Kristensen et al., 1993; Clarke et al., 1998; Wang et al., 2001*). Infatti, alcuni studi dimostrano invece come i livelli di Cbl non siano modificati nel siero dei pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer (*Basun et al., 1994; Joosten et al., 1997*). Recentemente è stato ipotizzato che lo stress ossidativo cerebrale, attraverso l'aumento dell'ossidazione della Cbl(I) a Cbl(II), potrebbe causare nella malattia di Alzheimer modificazioni dell'attività della metionina-sintetasi cerebrale che si riflettono sul metabolismo della OMOCIS (*McCaddon et al., 2002*). È stato inoltre recentemente osservato che il livello di holo-TC è associato alla malattia di Alzheimer più frequentemente di quanto non lo sia il livello di Cbl totale (*Refsum and Smith, 2003*). Quindi è ancora assolutamente dubbio se esista una relazione tra la carenza di Cbl e la patogenesi della malattia di Alzheimer.

6.3. Le demenze

Molto più simili a ciò che è stato precedentemente detto per la sclerosi multipla sono i dati riguardanti i bassi livelli sierici di Cbl nei pazienti con demenze non connesse alla malattia di Alzheimer (*Carmel et al., 1996; Regland*

et al., 1992). Molti dati clinici dimostrano un significativo miglioramento cognitivo al trattamento di questi pazienti con Cbl (*Carmel et al.*, 1995; *Teunisse et al.*, 1996; *Eastley et al.*, 2000; *Goebels and Soyka*, 2000; *Nilsson et al.*, 2000). Tuttavia è difficile credere, in assenza di prove cliniche certe, che la carenza di Cbl possa essere un fattore patogenetico delle demenze. Infine, risultati contrastanti sono stati ottenuti riguardo i livelli di Cbl nel siero di pazienti depressi (*Fava et al.*, 1997; *Tiemeier et al.*, 2002; *Bjelland et al.*, 2003).

7. Cenni sulle principali metodiche per la determinazione dei livelli di Cbl nei principali liquidi fisiologici umani e l'accertamento di uno stato carenziale in Cbl nell'uomo

Nonostante che ad un basso livello sierico di Cbl non debba necessariamente conseguire una carenza tessutale di Cbl, il dosaggio dei livelli sierici della Cbl rimane ancora oggi ampiamente utilizzato per la diagnosi di uno stato carenziale di Cbl (Carmel, 2004). I livelli normali di Cbl nel sangue dell'uomo sono compresi tra 250 e 500 pg/ml, mentre quelli del liquido cefalorachidiano umani sono compresi tra 10 e 30 pg/ml. Si possono poi eseguire dei dosaggi dei livelli sierici di MMA, di OMOCIS e di holo-TC per validare lo stato carenziale in Cbl. Come ricordato nel capitolo 5.2, i livelli sierici di MMA e OMOCIS sono aumentati in molti pazienti affetti da carenza acquisita di Cbl. Perciò il dosaggio di questi due metaboliti viene per questo motivo spesso affiancato a quello della Cbl nel siero di pazienti deficienti in Cbl. Lo MMA e l'OMOCIS vengono dosati con una tecnica di gas cromatografia su colonna capillare seguita da spettrometria di massa (Allen et al., 1990).

In passato il dosaggio della Cbl nel siero era compiuto mediante un saggio microbiologico che sfruttava la capacità di crescita di alcuni batteri in presenza di Cbl (Mollin et al., 1976). Successivamente si è utilizzato il dosaggio radioimmunologico che usa la Cbl, resa radioattiva nel Co, e il FI (Lee and Griffiths, 1985). Il dosaggio si esegue incubando quantità note di FI e Cbl radioattiva con un volume noto di siero del paziente e misurando poi la radioattività associata al complesso FI-Cbl. Il valore della radioattività misurato sarà inversamente proporzionale alla quantità di Cbl presente nel campione. Per quantificare la quantità di Cbl presente nel siero, il valore di radioattività ottenuto è confrontato con quello di una curva di taratura che riporta la variazione dei livelli di radioattività del complesso FI-Cbl all'aumentare della quantità di Cbl nota aggiunta alla reazione (principio della competizione). Per la realizzazione di questa curva, le quantità di Cbl radioattiva e FI devono essere le stesse di quelle usate per il dosaggio del campione sierico. Più recentemente il metodo radioimmunologico è stato affiancato da un metodo di dosaggio immuno-enzimatico, chiamato MEIA (Microparticles Enzymatic Immune Assay). Esso utilizza microparticelle ricoperte da FI suino, a cui si lega la Cbl libera presente nel campione sierico

del paziente. Successivamente si aggiunge Cbl coniugata con fosfatasi alcalina che si lega alle molecole di FI non ancora occupate dalla Cbl del campione sierico. La fosfatasi alcalina legata alla Cbl catalizza l'idrolisi di un fluorocromo, il 4-metilumbelliferil fosfato (MUP). Quantificando la fluorescenza del 4-metilumbelliferil (MU) mediante un sistema ottico di lettura si può calcolare la quantità del prodotto della reazione di idrolisi formatasi. Anche in questo caso la quantità di questo prodotto di idrolisi è inversamente proporzionale alla concentrazione di Cbl nel siero del paziente.

La holo-TC sierica rappresenta la porzione di molecole di TC legate alla Cbl ed è considerata un valido indicatore di uno stato acquisito di carenza in Cbl in quanto essa indica la quota di Cbl trasportata ed accessibile alle cellule dell'organismo (Nexø et al., 2002). Per misurare la holo-TC, il siero del paziente viene incubato in presenza di biglie magnetiche ricoperte da Cbl; la Cbl si lega alla apo-TC (molecole di TC non legate alla Cbl) sequestrandola e separandola dalla holo-TC (Nexø et al., 2002). A questo punto è possibile dosare con una tecnica immunoenzimatica la holo-TC.

Oltre al dosaggio dei livelli della Cbl e degli altri parametri biochimici nel siero, la valutazione dell'assorbimento della Cbl è il primo punto di indagine per la valutazione diagnostica di uno stato carenziale in Cbl, perché circa il 95% dei pazienti adulti con carenza acquisita in Cbl presentano patologie dell'assorbimento della vitamina. Il test di Schilling è classicamente usato per valutare la funzionalità dell'assorbimento intestinale della Cbl, in quanto esso misura l'escrezione urinaria di una quantità nota di CN-Cbl cristallina resa radioattiva nel Co (approssimativamente uguale alla quantità di Cbl ingerita in un pasto normale) e somministrata per via orale. Il test di Schilling si effettua su pazienti a digiuno e che non abbiano ricevuto iniezioni di Cbl da almeno tre giorni. Per minimizzare il fatto che la Cbl sia assorbita in maniera diversa dai tessuti, al paziente sono somministrati anche 100 µg di CN-Cbl per via intramuscolare entro due ore dalla dose per via orale. Le urine del paziente sono quindi raccolte per ventiquattro ore e se la radioattività escreta è subnormale, cioè meno del 8% della dose orale, il test deve essere ripetuto somministrando per via orale, insieme alla Cbl, una dose di FI. Questa correzione consente anche di accertare l'assenza o la ridotta produzione del FI. Se la quantità di Cbl escreta rimane ancora anormale, la carenza di Cbl non è dovuta alla mancata presenza del FI nel paziente.

8. Bibliografia

- Adachi S., Kawamoto T., Otsuka M., Todoroki T. and Fukao K. (2000). Enteral vitamin B₁₂ supplements reverse postgastrectomy B₁₂ deficiency. *Ann Surg* 232, 199-201.
- Addison T. (1849). Anaemia-disease of the supra-renal capsules. *London Medical Gazette* 43, 517-518.
- Allan S.M. and Rothwell N.J. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2, 734-744.
- Allen R.H., Seetharam B., Podell E. and Alpers D.H. (1978). Effect of proteolytic enzymes on the binding of cobalamin to R protein and intrinsic factor. In vitro evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency. *J Clin Invest* 61, 47-54.
- Allen R.H., Stabler S.P., Savage D.G. and Lindenbaum J. (1990). Diagnosis of cobalamin deficiency I: Usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 34, 90-98.
- Allen R.H. (1996). Megaloblastic anemias. In: Cecil Textbook of Medicine, 20th ed., W.B. Saunders Co, Bennet T.C. and Plum F., Eds., pp. 843-851.
- Aminoff M., Carter J.E., Chadwick R.B., Johnson C., Grasbeck R., Abdelaal M.A., Broch H., Jenner L.B., Verroust P.J., Moestrup S.K., de la Chapelle A. and Krahe R. (1999). Mutations in CUBN, encoding the intrinsic factor-vitamin B₁₂ receptor, cubilin, cause hereditary megaloblastic anaemia 1. *Nat Genet* 21, 309-313.
- Antony A.C. (2000). Megaloblastic anemias. In: Hematology. Basic principles and practice. Hoffman R., Benz E.J. Jr., Shattil S.J., Furie B., Cohen H.J., Silberstein L.E. and McGlave P., Eds., Churchill Livingstone, New York, pp. 446-485.
- Babior B.M. (2001). The megaloblastic anemias. In: Hematology. Beutler E., Lichtman M., Coller B.S., Kipps T.J. and Seligsohn U., Eds., Mc Graw-Hill, Inc., pp. 425-445.
- Backer S.J. and Mathan V.I. (1970). Tropical sprue in the Southern India. In: Tropical Sprue and Megaloblastic Anaemia, Wellcome Trust Collaborative Study, Churchill & Sons, London, pp. 189-260.
- Bassi S.S., Bulundwe K.K., Greeff G.P., Labuscagne J.H. and Gledhill R.F. (1999). MRI of the spinal cord in myelopathy complicating vitamin B₁₂ deficiency: Two additional cases and a review of the literature. *Neuroradiology* 41, 271-274.

- Basun H., Fratiglioni L. and Winblad B. (1994). Cobalamin levels are not reduced in Alzheimer's disease: Results from a population-based study. *J Am Geriatr Soc* 42, 132-136.
- Beck W.S. (1975). In: Cobalamin. Biochemistry and Pathophysiology. Babior B.M., Ed., John Wiley & Sons, Inc., Cap. 9: pp. 403-450.
- Beck W.S. (1991). Neuropsychiatric consequences of cobalamin deficiency. *Adv Int Med* 36, 33-56.
- Benveniste E.N. (1997). Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 75, 165-173.
- Benveniste E.N. (1998). Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 9, 259-275.
- Biermer A. (1872). Über eine Form von progressiver Anämie. *Korrespondenzbl Schweiz Aerzte* 2, 15-25.
- Birn H., Verroust P.J., Nexø E., Hager H., Jacobsen C., Christensen E.I. and Moestrup S.K. (1997). Characterization of an epithelial approximately 460-kDa protein that facilitates endocytosis of intrinsic factor-vitamin B₁₂ and binds receptor-associated protein. *J Biol Chem* 272, 26497-26504.
- Bjelland I., Tell G.S., Vollset S.E., Refsum H. and Ueland P.M. (2003). Folate, vitamin B₁₂, homocysteine, and the MTHFR 677CA → T polymorphism in anxiety and depression. *Arch Gen Psychiatry* 60, 618-626.
- Blum-Degen D., Müller T., Kuhn W., Gerlach M., Przuntek H. and Rieder P. (1995). Interleukin-1β and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 202, 17-20.
- Bose S. and Seetharam B. (1997). Effect of disulfide bonds of transcobalamin II receptor on its activity and basolateral targeting in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *J Biol Chem* 272, 20920-20928.
- Bose S., Seetharam S., Hammond T.G. and Seetharam B. (1995). Regulation of expression of transcobalamin II receptor in the rat. *Biochem J* 310, 923-929.
- Bottiglieri T. (1996). Folate, vitamin B₁₂ and neuropsychiatric disorders. *Nutr Rev* 54, 382-390.
- Briddon A. (2003). Homocysteine in the context of cobalamin metabolism and deficiency states. *Amino Acids* 24, 1-12.
- Brink N.G., Kuehl F.A. Jr. and Folkers K. (1950). Vitamin B₁₂: The identification of vitamin B₁₂ as a cyano-cobalt coordination complex. *Science* 112, 354.
- Brosnan C.F., Cannella B., Battistini L. and Raine C.S. (1995). Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: Correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. *Neurology* 45, S16-S21.
- Brown A.J., Dusso A. and Slatopolsky E. (1999). Vitamin D. *Am J Physiol* 277, F157-F175.

- Buccellato F.R., Miloso M., Braga M., Nicolini G., Morabito A., Pravettoni G., Tredici G. and Scalabrino G. (1999). Myelinolytic lesions in spinal cord of cobalamin-deficient rats are TNF- α -mediated. *FASEB J* 13, 297-304.
- Cairo G., Ronchi R., Buccellato F.R., Veber D., Santambrogio P. and Scalabrino G. (2002). Regulation of the ferritin H subunit by vitamin B₁₂ (cobalamin) in rat spinal cord. *J Neurosci Res* 69, 117-124.
- Carmel R. (1981). Cobalamin-binding proteins in man. In: *Contemporary hematology-oncology*. Silber R., Gordon A.S., Lobue J., Muggio F.M., Eds., Plenum Publishing, New York, pp. 79-129.
- Carmel R. (1988). Pernicious anemia. The expected findings of very low serum cobalamin levels, anemia, and macrocytosis are often lacking. *Arch Int Med* 148, 1712-1714.
- Carmel R. (2004). Megaloblastic anemias: Disorders of impaired DNA synthesis. In: *Wintrobe's clinical hematology*, 10th ed., Greer J.P., Foerster J., Lukens J.N., Rodgers G.M., Paraskevas F. and Glader B., Eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1367-1395.
- Carmel R., Gott P.S., Waters C.H., Cairo K., Green R., Bondareff W., DeGiorgio C.M., Cummings J.L., Jacobsen D.W., Buckwalter G. and Henderson V.W. (1995). The frequently low cobalamin levels in dementia usually signify treatable metabolic, neurologic and electrophysiologic abnormalities. *Eur J Haematol* 54, 245-253.
- Carmel R., Cairo K., Bondareff W., Gott P.S., Cummings J.L. and Henderson V.W. (1996). Spouses of demented patients with low cobalamin levels: A new risk group for cobalamin deficiency. *Eur J Haematol* 57, 62-67.
- Carmel R., Green R., Rosenblatt D.S. and Watkins D. (2003a). Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, pp. 62-81.
- Carmel R., Melnyk S. and James S.J. (2003b). Cobalamin deficiency with and without neurologic abnormalities: differences in homocysteine and methionine metabolism. *Blood* 101, 3302-3308.
- Castle W.B., Heath C.W., Strauss M.B. and Heile R.W. (1937). Observations on etiologic relationship of achylia gastrica to pernicious anemia. VI. Site of interaction of food (extrinsic) and gastric (intrinsic) factors: Failure of *in vitro* incubation to produce thermostable hematopoietic principle. *Am J Med Sci* 14, 618-625.
- Chatterjee A., Yapundich R., Palmer C.A., Marson D.C. and Mitchell G.W. (1996). Leukoencephalopathy associated with cobalamin deficiency. *Neurology* 46, 832-834.
- Chen L.H., Liu M.-L., Hwang H.-Y., Chen L.-S., Korenberg J. and Shane B. (1997). Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem* 272, 3628-3634.

- Chitnis T. and Khoury S.J. (2003). Cytokine shifts and tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Res* 28, 223-239.
- Christensen E.I. and Birn H. (2001). Megalin and cubilin: Synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol* 280, F562-F573.
- Christensen E.I. and Birn H. (2002). Megalin and cubilin: Multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 256-266.
- Clarke R., Smith A.D., Jobst K.A., Refsum H., Sutton L. and Ueland P.M. (1998). Folate, vitamin B₁₂, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 55, 1449-1455.
- Combs J.F. Jr. (1998). Vitamin B₁₂. In: *The Vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health*. Academic Press, London, pp. 403-420.
- Connor B. and Dragunow M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Rev* 27, 1-39.
- Das K.C. and Herbert V. (1989). In vitro DNA synthesis by megaloblastic bone marrow: Effect of folates and cobalamins on thymidine incorporation and de novo thymidylate synthesis. *Am J Hematol* 31, 11-20.
- Davis C.G., Goldstein J.L., Sudhof T.C., Anderson R.G., Russell D.W. and Brown M.S. (1987). Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 326, 760-765.
- Di Marco R., Khademi M., Wallstrom E., Iacobaeus E., Selvaggio A., Caracappa S., Papoian R., Nicoletti F. and Olsson T. (2001). Curative effects of recombinant human interleukin-6 in DA rats with protracted relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 116, 168-177.
- Eastley R., Wilcock G.K. and Bucks R.S. (2000). Vitamin B₁₂ deficiency in dementia and cognitive impairment: The effects of treatment on neuropsychological function. *Int J Geriatr Psychiat* 15, 226-233.
- Ellis B., Petrow V. and Snook G.F. (1949). The chemistry of anti-pernicious anaemia factors; the ninhydrin-reacting hydrolytic fragment of vitamin B₁₂. *J Pharm Pharmacol* 1, 950-956.
- Enns G.M., Barkovich A.J., Rosenblatt D.S., Fredrick D.R., Weisiger K., Ohnstad C. and Packman S. (1999). Progressive neurological deterioration and MRI changes in cblC methylmalonic acidaemia treated with hydroxocobalamin. *J Inherit Metab Dis* 22, 599-607.
- Fava M., Borus J.S., Alpert J.E., Nierenberg A.A., Rosenbaum J.F. and Bottiglieri T. (1997). Folate, vitamin B₁₂, and homocysteine in major depressive disorder. *Am J Psychiatry* 154, 426-428.
- Fine E.J., Soria E., Paroski M.W., Petryk D. and Thomasula L. (1990). The neurophysiological profile of vitamin B₁₂ deficiency. *Muscle Nerve* 13, 158-164.
- Frequin S.T.F.M., Wevers R.A., Braam M., Barkhof F. and Hommes O.R. (1993). Decreased vitamin B₁₂ and folate levels in cerebrospinal fluid and

- serum of multiple sclerosis patients after high-dose intravenous methylprednisolone. *J Neurol* 240, 305-308.
- Gadient R.A. and Otten U.H. (1997). Interleukin-6(IL-6)—A molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol* 52, 379-390.
- Gianazza E., Veber D., Eberini I., Buccellato F.R., Mutti E., Sironi L. and Scalabrino G. (2003). Cobalamin (vitamin B₁₂)-deficiency-induced changes in the proteome of rat cerebrospinal fluid. *Biochem J* 374, 239-246.
- Goebels N. and Soyka M. (2000). Dementia associated with vitamin B₁₂ deficiency: Presentation of two cases and review of the literature. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 12, 389-394.
- Goodkin D.E., Jacobsen D.W., Galvez N., Daughtry M., Secic M. and Green R. (1994). Serum cobalamin deficiency is uncommon in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 51, 1110-1114.
- Gordon M.M., Brada N., Remacha A., Badell I., del Rio E., Baiget M., Santer R., Quadros E.V., Rothenberg S.P. and Alpers D.H. (2004). A genetic polymorphism in the coding region of the gastric intrinsic factor gene (GIF) is associated with congenital intrinsic factor deficiency. *Hum Mutat* 23, 85-91.
- Grasbeck R., Nyberg W. and Reizenstein P. (1958). Biliary and fecal vitamin B₁₂ excretion in man: An isotope study. *Proc Soc Exp Biol Med* 97, 780-784.
- Groul D.L. and Nelson T.E. (1997). Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 15, 307-339.
- Harper C. and Butterworth R. (2002). Nutritional and metabolic disorders. In: *Greenfield's Neuropathology*. Graham D.I. and Lantos P.L., Eds., Arnold, London, pp. 607-652.
- Healton E.B., Savage D.G., Brust J.C.M., Garrett T.J. and Lindenbaum J. (1991). Neurologic aspects of cobalamin deficiency. *Medicine* 70, 229-245.
- Heckmann J.G., Lang C.J.G., Ganslandt O., Tomandl B. and Neundörfer B. (2003). Reversible leukoencephalopathy due to vitamin B₁₂ deficiency in an acromegalic patient. *J Neurol* 250, 366-368.
- Hewitt J.E., Gordon M.M., Taggart R.T., Mohandas T.K. and Alpers D.H. (1991). Human gastric intrinsic factor: Characterization of cDNA and genomic clones and localization to human chromosome 11. *Genomics* 10, 432-440.
- Hodgkin D.C., Pickworth J., Robertson J.H., Trueblood K.N., Prosen R.J. and White J.G. (1955). The crystal structure of the hexacarboxylic acid derived from B₁₂ and the molecular structure of the vitamin. *Nature* 176, 325-330.
- Hutto B.R. (1997). Folate and cobalamin in psychiatric illness. *Compr Psychiat* 38, 305-314.
- Ikeda M., Asai M., Moriya T., Sagara M., Inoue S. and Shibata S. (1998). Methylcobalamin amplifies melatonin-induced circadian phase shifts by facilitation of melatonin synthesis in the rat pineal gland. *Brain Res* 795, 98-104.

- Ikeda T., Furukawa Y., Mashimoto S., Takahashi K. and Yamada M. (1990). Vitamin B₁₂ levels in serum and cerebrospinal fluid of people with Alzheimer's disease. *Acta Psychiatr Scand* 82, 327-329.
- Johnston J., Yang-Feng T. and Berliner N. (1992). Genomic structure and mapping of the chromosomal gene for transcobalamin I (TCN1): Comparison to human intrinsic factor. *Genomics* 12, 459-464.
- Jooster E., Lesaffre E., Riezler R., Ghekiere V., Dereymaeker L., Pelemans W. and Dejaeger E. (1997). Is metabolic evidence for vitamin B-12 and folate deficiency more frequent in elderly patients with Alzheimer's disease? *J Gerontol* 52, M76-M79.
- Kalantry S., Manning S., Haub O., Tomihara-Newberger C., Lee H.G., Fangman J., Distèche C.M., Manova K. and Lacy E. (2001). The amnionless gene, essential for mouse gastrulation, encodes a visceral-endoderm-specific protein with an extracellular cysteine-rich domain. *Nat Genet* 27, 412-416.
- Kass L. (1976). Clinical and hematological features of pernicious anemia. In: *Pernicious anemia*. Smith L.H., Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 63-115.
- King C.E., Leibach J. and Toskes P.P. (1979). Clinically significant vitamin B₁₂ deficiency secondary to malabsorption of protein-bound vitamin B₁₂. *Dig Dis Sci* 24, 397-402.
- Klipstein F.A. (1970). Tropical sprue in the Western hemisphere. In: *Tropical Sprue and Megaloblastic Anaemia*. Wellcome Trust Collaborative Study, Churchill & Sons, London, pp. 129-158.
- Kordek R., Nerurkar V.R., Liberski P.P., Isaacson S., Yanagihara R. and Gajdusek D.C. (1996). Heightened expression of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 alpha, and glial fibrillary acidic protein in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 9754-9758.
- Kristensen M.Ø., Gulmann N.C., Christensen J.E.J., Østergaard K. and Rasmussen K. (1993). Serum cobalamin and methylmalonic acid in Alzheimer dementia. *Acta Neurol Scand* 87, 475-481.
- Kristiansen M., Aminoff M., Jacobsen C., de la Chapelle A., Krahe R., Verroust P.J. and Moestrup S.K. (2000). Cubilin P1297L mutation associated with hereditary megaloblastic anemia 1 causes impaired recognition of intrinsic factor-vitamin B₁₂ by cubilin. *Blood* 96, 405-409.
- Kunze K. and Leitenmaier K. (1976). Vitamin B₁₂ deficiency and subacute combined degeneration of the spinal cord (funicular spinal disease). In: *Metabolic and deficiency diseases of the nervous system (part II)*. Vinken P.J., Bruyn G.W. and Klawans H.L., Eds, In: *Handbook of clinical neurology*. Vinken P.J. and Bruyn G.W., Eds., Elsevier, Amsterdam, Cap. 28: pp. 141-198.

- Leclerc D., Odievre M., Wu Q., Wilson A., Huizenga J.J., Rozen R., Scherer S.W. and Gravel R.A. (1999). Molecular cloning, expression and physical mapping of the human methionine synthase reductase gene. *Gene* 240, 75-88.
- Lee D.S. and Griffiths B.W. (1985). Human serum vitamin B₁₂ assay methods—a review. *Clin Biochem* 18, 261-266.
- Lin J.C., Borregaard N., Liebman H.A. and Carmel R. (2001). Deficiency of the specific granule proteins, R-binder/transcobalamin I and lactoferrin, in plasma and saliva: A new disorder. *Am J Med Genet* 100, 145-151.
- Lindenbaum J., Heaton E.B., Savage D.G., Brust J.C., Garrett T.J., Podell E.R., Marcell P.D., Stabler S.P. and Allen R.H. (1988). Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 318, 1720-1728.
- Linnell J.C. (1975). The fate of cobalamins in vivo. In: *Cobalamin. Biochemistry and Pathophysiology*. Babior B.M., Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 287-333.
- Lipton S.A., Kim W.-K., Choi Y.-B., Kumar S., D'Emilia D.M., Rayudu P.V., Arnelle D.R. and Stamler J.S. (1997). Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 5923-5928.
- Loder C., Allawi J. and Horrobin D.F. (2002). Treatment of multiple sclerosis with lofepramine, L-phenylalanine and vitamin B₁₂: mechanism of action and clinical importance: Roles of the locus coeruleus and central noradrenergic systems. *Med Hypotheses* 59, 594-602.
- Magnaghi V., Veber D., Morabito A., Buccellato F.R., Melcangi R.C. and Scalabrino G. (2002). Decreased GFAP-mRNA expression in spinal cord of cobalamin-deficient rats. *FASEB J* 16, 1820-1822 (On line : *FASEB J*. 2002 Settembre 19, 10.1096/fj.02-0231fje).
- Martens J.-H., Barg H., Warren M.J. and Jahn D. (2002). Microbial production of vitamin B₁₂. *Appl Microbiol Biotechnol* 58, 275-285.
- Matthews R.G. (1999). Cobalamin-dependent methionine synthase. In: *Chemistry and biochemistry of B₁₂*. Banerjee R., Ed., J. Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 681-706.
- McCaddon A., Regland B., Hudson P. and Davies G. (2002). Functional vitamin B₁₂ deficiency and Alzheimer disease. *Neurology* 58, 1395-1399.
- Metz J. and van der Westhuyzen J. (1987). The fruit bat as an experimental model of the neuropathy of cobalamin deficiency. *Comp Biochem Physiol* 88A, 171-177.
- Miller J.W., Ramos M.I., Garrod M.G., Flynn M.A. and Green R. (2002). Transcobalamin II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B₁₂ status in healthy older adults. *Blood* 100, 718-720.

- Minot G.R. and Murphy W.P. (1926). Treatment of pernicious anemia by special diet. *JAMA* 14, 470-476.
- Mollin D.L., Anderson B.B. and Burnan J.F. (1976). The serum vitamin B₁₂ level: Its assay and significance. *Clin Haematol* 5, 521-546.
- Moestrup S.K. and Verroust P.J. (2001). Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr* 21, 407-428.
- Moestrup S.K., Kozyraki R., Kristiansen M., Kaysen J.H., Rasmussen H.H., Brault D., Pontillon F., Goda F.O., Christensen E.I., Hammond T.G. and Verroust P.J. (1998). The intrinsic factor-vitamin B₁₂ receptor and target of teratogenic antibodies is a megalin-binding peripheral membrane protein with homology to developmental proteins. *J Biol Chem* 273, 5235-5242.
- Molloy A.M. and Weir D.G. (2001). Homocysteine and the nervous system. In: *Homocysteine in health and disease*. Carmel R., Jacobsen D.W., Eds., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 183-197.
- Müller T., Blum-Degen D., Przuntek H. and Kuhn W. (1998). Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlate to the severity of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 98, 142-144.
- Muñoz-Fernández M.A. and Fresno M. (1998). The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol* 56, 307-340.
- Nexø E., Christensen A.L., Hvas A.M., Petersen T.E. and Fedosov S.N. (2002). Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B₁₂ deficiency. *Clin Chem* 48, 561-562.
- Nijst T.Q., Wevers R.A., Schoonderwaldt H.C., Hommes O.R. and de Haan A.F.J. (1990). Vitamin B₁₂ and folate concentrations in serum and cerebrospinal fluid of neurological patients with special reference to multiple sclerosis and dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53, 951-954.
- Nilsson K., Warkentin S., Hultberg B., Fäldt R. and Gustafson L. (2000). Treatment of cobalamin deficiency in dementia, evaluated clinically and with cerebral blood flow measurements. *Aging Clin Exp Res* 12, 199-207.
- Nonne M. (1893). Beiträge zur Kenntnis der im Verlauf der perniziösen Anämie beobachteten Spinalerkrankungen. *Arch Psychiat Nervenkr* 25, 421-449.
- Noseworthy J.H., Lucchetti C., Rodriguez M. and Weinshenker B.G. (2000). Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343, 938-952.
- Oltean S. and Banerjee R. (2003). Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B₁₂. *J Biol Chem* 278, 20778-20784.
- Orlando R.A., Rader K., Authier F., Yamazaki H., Posner B.I., Bergeron J.J. and Farquhar M.G. (1998). Megalin is an endocytic receptor for insulin. *J Am Soc Nephrol* 9, 1759-1766.

- Pant S.S., Asbury A.K. and Richardson E.P. Jr. (1968). The myelopathy of pernicious anemia. A neuropathological reappraisal. *Acta Neurol Scand* 44, (Suppl. 35), 8-36.
- Peracchi M., Bamonti Catena F., Pomati M., De Franceschi M. and Scalabrino G. (2001). Human cobalamin deficiency: Alterations in serum tumour necrosis factor- α and epidermal growth factor. *Eur J Haematol* 67, 123-127.
- Powers J. (1996). Pathology of myelin. *Mol Chem Neuropathol* 27, 31-38.
- Przedborski S., Vila M. and Jackson-Lewis V. (2003). Neurodegeneration: What is it and where are we? *J Clin Invest* 111, 3-10.
- Raivich G., Bohatschek M., Kloss C.U.A., Werner A., Jones L.L. and Kreutzberg G.W. (1999). Neuroglial activation repertoire in the injured brain: Graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Rev* 30, 77-105.
- Rasmussen S.A., Fernhoff P.M. and Scanlon K.S. (2001). Vitamin B₁₂ deficiency in children and adolescents. *J Pediatr* 138, 10-17.
- Raychowdhury R., Niles J.L., McCluskey R.T. and Smith J.A. (1989). Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL receptor. *Science* 244, 1163-1165.
- Refsum H. and Smith A.D. (2003). Low vitamin B₁₂ status in confirmed Alzheimer's disease as revealed by serum holotranscobalamin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 959-961.
- Register U.D. and Sarett H.P. (1951). Urinary excretion of vitamin B₁₂, folic acid, and citrovorum factor in human subjects on various diets. *Proc Soc Exp Biol Med* 77, 837-839.
- Regland B., Abrahamsson L., Blennow K., Gottfries C.G. and Wallin A. (1992). Vitamin B₁₂ in CSF: Reduced CSF/serum B₁₂ ratio in demented men. *Acta Neurol Scand* 85, 276-281.
- Reynolds E.H. (1992a). Multiple sclerosis and vitamin B₁₂ metabolism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55, 339-340.
- Reynolds E.H. (1992b). Multiple sclerosis and vitamin B₁₂ metabolism. *J Neuroimmunol* 40, 225-230.
- Reynolds E.H., Linnell J.C. and Faludy J.E. (1991). Multiple sclerosis associated with vitamin B₁₂ deficiency. *Arch Neurol* 48, 808-811.
- Reynolds E.H., Bottiglieri T., Laundry M., Crellin R.F. and Kirker S.G. (1992). Vitamin B₁₂ metabolism in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 49, 649-652.
- Rickes E.L., Brink N.G., Koniuszy F.R., Wood T.R. and Folkers K. (1948a). Crystalline vitamin B₁₂. *Science* 107, 396-397.
- Rickes E.L., Brink N.G., Koniuszy F.R., Wood T.R. and Folkers K. (1948b). Comparative data on vitamin B₁₂ from liver and from a new source, *Streptomyces griseus*. *Science* 106, 634-635.
- Rodriguez M., Pavelko K.D., McKinney C.W. and Leibowitz J.L. (1994). Recombinant human IL-6 suppresses demyelination in a viral model of multiple sclerosis. *J Immunol* 153, 3811-3821.

- Rosenblatt D.S., Aspler A.L., Shevell M.I., Pletcher B.A., Fenton W.A. and Seashore M.R. (1997). Clinical heterogeneity and prognosis in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC). *J Inherit Metab Dis* 20, 528-538.
- Rosenblatt D.S. and Fenton W.A. (2001). Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. In: *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. and Valle D., Eds., McGraw-Hill, New York, pp. 3897-3933.
- Rosenblatt D.S., Hosack A., Matiaszuk N.V., Cooper B.A. and Laframboise R. (1985). Defect in vitamin B₁₂ release from lysosomes: Newly described inborn error of vitamin B₁₂ metabolism. *Science* 228, 1319-1321.
- Russell J.S.R., Batten F.E. and Collier J. (1900). Subacute combined degeneration of the spinal cord. *Brain* 23, 39-110.
- Saperstein D.S., Wolfe G.I., Gronseth G.S., Nations S.P., Herbelin L.L., Bryan W.W. and Barohn R.J. (2003). Challenges in the identification of cobalamin-deficiency polyneuropathy. *Arch Neurol* 60, 1296-1301.
- Savage D.G. and Lindenbaum J. (1995). Neurological complications of acquired cobalamin deficiency: Clinical aspects. *Baillière's Clin Haematol* 8, 657-678.
- Scalabrino G. (2001). Subacute combined degeneration one century later. The neurotrophic action of cobalamin (vitamin B₁₂) revisited. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 109-120.
- Scalabrino G., Monzio-Compagnoni B., Ferioli M.E., Lorenzini E.C., Chiodini E. and Candiani R. (1990). Subacute combined degeneration and induction of ornithine decarboxylase in spinal cords of totally gastrectomized rats. *Lab Invest* 62, 297-304.
- Scalabrino G., Lorenzini E.C., Monzio-Compagnoni B., Colombi R.P., Chiodini E. and Buccellato F.R. (1995). Subacute combined degeneration in the spinal cord of totally gastrectomized rats. Ornithine decarboxylase induction, cobalamin status, and astroglial reaction. *Lab Invest* 72, 114-123.
- Scalabrino G., Buccellato F.R., Tredici G., Morabito A., Lorenzini E.C., Allen R.H. and Lindenbaum J. (1997). Enhanced levels of biochemical markers for cobalamin deficiency in totally gastrectomized rats: Uncoupling of the enhancement from the severity of spongy vacuolation in spinal cord. *Exp Neurol* 144, 258-265.
- Scalabrino G., Nicolini G., Buccellato F.R., Peracchi M., Tredici G., Manfredi A. and Pravettoni G. (1999). Epidermal growth factor as a local mediator of the neurotrophic action of vitamin B₁₂ (cobalamin) in the rat central nervous system. *FASEB J* 13, 2083-2090.
- Scalabrino G., Tredici G., Buccellato F.R. and Manfredi A. (2000). Further evidence for the involvement of epidermal growth factor in the signaling

- pathway of vitamin B₁₂ (cobalamin) in the rat central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 808-814.
- Scalabrino G., Corsi M.M., Veber D., Buccellato F.R., Pravettoni G., Manfredi A. and Magni P. (2002). Cobalamin (vitamin B₁₂) positively regulates interleukin-6 levels in rat cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 127, 37-43.
- Scalabrino G., Carpo M., Bamonti F., Pizzinelli S., D'Avino C., Bresolin N., Meucci G., Martinelli V., Comi G.C. and Peracchi M. (2004). High tumor necrosis factor- α levels in cerebrospinal fluid of cobalamin-deficient patients. *Ann Neurol* 56, 886-890.
- Schjonsby H. (1972). The in vivo uptake of vitamin B 12 by intestinal bacteria in rats with jejunal blind loops. *Scand J Gastroenterol* 7, 455-461.
- Schjonsby H. (1973). The mechanism of vitamin B 12 malabsorption in blind-loop syndrome. *Scand J Gastroenterol* 8, 97-99.
- Scott J.M., Dinn J.J., Wilson P. and Weir D.G. (1981). Pathogenesis of subacute combined degeneration: A result of methyl group deficiency. *Lancet ii*, 334-337.
- Seetharam B. (1994). Gastrointestinal absorption and transport of cobalamin (vitamin B₁₂). In: *Physiology of Gastrointestinal Tract*. Johnson L., Ed., Raven Press, New York, pp. 1997-2026.
- Seetharam B. (1999). Receptor-mediated endocytosis of cobalamin (vitamin B₁₂). *Annu Rev Nutr* 19, 173-195.
- Seetharam B. and Yammani R.R. (2003). Cobalamin transport proteins and their cell-surface receptors. *Expert Rev Mol Med* 13, 1-18.
- Sekizawa T., Openshaw H., Ohbo K., Sugamura K., Itoyama Y. and Niland J.C. (1998). Cerebrospinal fluid interleukin 6 in amyotrophic lateral sclerosis: Immunological parameter and comparison with inflammatory and non-inflammatory central nervous system diseases. *J Neurol Sci* 154, 194-199.
- Selmaj K.W. and Raine C.S. (1995). Experimental autoimmune encephalomyelitis: Immunotherapy with anti-tumor necrosis factor antibodies and soluble tumor necrosis factor receptors. *Neurology* 45, S44-S49.
- Sharief M.K. and Thompson E.J. (1992). In vivo relationship of tumor necrosis factor- α to blood-brain barrier damage in patients with active multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 38, 27-34.
- Smith E.L. and Parker L.F.J. (1948). Purification of antipernicious anaemia factor. *Biochem J* 43, viii-ix.
- Sourial N.A., Amess J.A.L. and Amos R.J. (1985). Role of S-adenosylmethionine in DNA synthesis and haemopoiesis. *Scand J Haematol* 34, 303-307.
- Sousa M.M., Norden A.G., Jacobsen C., Willnow T.E., Christensen E.I., Thakker R.V., Verroust P.J., Moestrup S.K. and Saraiva M.J. (2000). Evidence for the role of megalin in renal uptake of transthyretin. *J Biol Chem* 275, 38176-38181.

- Stenberg E.M. (1997). Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest* 100, 2641-2647.
- Surtees R. (1993). Biochemical pathogenesis of subacute combined degeneration of the spinal cord and brain. *J Inher Metab Dis* 16, 762-770.
- Suter P.M., Golner B.B., Goldin B.R., Morrow F.D. and Russell R.M. (1991). Reversal of protein-bound vitamin B₁₂ malabsorption with antibiotics in atrophic gastritis. *Gastroenterology* 101, 1039-1045.
- Tamura J., Kubota K., Murakami H., Sawamura M., Matsushima T., Tamura T., Saitoh T., Kurabayashi H. and Naruse T. (1999). Immunomodulation by vitamin B₁₂: Augmentation of CD8⁺ T lymphocytes and natural killer (NK) cell activity in vitamin B₁₂-deficient patients by methyl-B₁₂ treatment. *Clin Exp Immunol* 116, 28-32.
- Tanner S.M., Aminoff M., Wright F.A., Liyanarachchi S., Kuronen M., Saarinen A., Massika O., Mandel H., Broch H. and de la Chapelle A. (2003). Amnionless, essential for mouse gastrulation, is mutated in recessive hereditary megaloblastic anemia. *Nat Genet* 33, 426-429.
- Teunisse S., Bollen A.E., van Gool W.A. and Walstra G.J.M. (1996). Dementia and subnormal levels of vitamin B₁₂: Effects of replacement therapy on dementia. *J Neurol* 243, 522-529.
- Tiemeier H., van Tuijl H.R., Hofman A., Meijer J., Kiliaan A.J. and Breteler M.M.B. (2002). Vitamin B₁₂, folate, and homocysteine in depression: The Rotterdam study. *Am J Psychiatry* 159, 2099-2101.
- Tovey F.I., Godfrey J.E. and Lewin M.R. (1990). A gastrectomy population: 25-30 years on. *Postgrad Med J* 66, 450-456.
- Tredici G., Buccellato F.R., Cavaletti G. and Scalabrino G. (1998a). Subacute combined degeneration in totally gastrectomized rats: An ultrastructural study. *J Submicrosc Cytol Pathol* 30, 165-173.
- Tredici G., Buccellato F.R., Braga M., Cavaletti G., Ciscato P., Moggio A. and Scalabrino G. (1998b). Polyneuropathy due to cobalamin deficiency in the rat. *J Neurol Sci* 156, 18-29.
- Tsaïoun K.I. (1999). Vitamin K-dependent proteins in the developing and aging nervous system. *Nutr Rev* 57, 231-240.
- Verroust P.J., Birn H., Nielsen R., Kozyraki R. and Christensen E.I. (2002a). The tandem endocytic receptors megalin and cubilin are important proteins in renal pathology. *Kidney Int* 62, 745-756.
- Verroust P.J. and Christensen E.I. (2002b). Megalin and cubilin - The story of two multipurpose receptors unfolds. *Nephrol Dial Transplant* 17, 1867-1871.
- Vitkovic L., Bockaert J. and Jacque C. (2000). "Inflammatory" cytokines: Neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* 74, 457-471.
- Vrethem M., Mattsson E., Hebelka H., Leerbeck K., Österberg A., Landtblom A.-M., Balla B., Nilsson H., Hultgren M., Brattström L. and Kägedal B. (2003). Increased plasma homocysteine levels without signs of vitamin

- B₁₂ deficiency in patients with multiple sclerosis assessed by blood and cerebrospinal fluid homocysteine and methylmalonic acid. *Mult Scler* 9, 239-245.
- Wang H.-X. (2002). Vitamin B₁₂, folate, and Alzheimer's disease. *Drug Develop Res* 56, 111-122.
- Wang H.X., Wahlin Å., Basun H., Fastbom J., Winblad B. and Fratiglioni L. (2001). Vitamin B₁₂ and folate in relation to the development of Alzheimer's disease. *Neurology* 56, 1188-1194.
- Watkins D., Matiaszuk N. and Rosenblatt D.S. (2000). Complementation studies in the *CblA* class of inborn error of cobalamin metabolism: Evidence for interallelic complementation and for a new complementation class (*CblH*). *J Med Genet* 37, 510-513.
- Weir D.G. and Scott J.M. (1995). The biochemical basis of the neuropathy in cobalamin deficiency. *Baillière's Clin Haemat* 8, 479-497.
- Weisenhorn D.M., Roback J., Young A.N. and Wainer B.H. (1999). Cellular aspects of trophic actions in the nervous system. *Int Rev Cytol* 189, 177-265.
- Wen J., Gordon M.M. and Alpers D.H. (1997). A receptor binding site on intrinsic factor is located between amino acids 25-44 and interacts with other parts of the protein. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 348-351.
- Whipple G.H., Hooper C.W. and Robscheit F.S. (1920). Blood regeneration following anemia. IV. Influence of meat, liver, and various extractives, alone or combined with standard diets. *Am J Physiol* 14, 236-262.
- Wickramasinghe S.N. (1999). The wide spectrum and unresolved issues of megaloblastic anemia. *Semin Hematol* 36, 3-18.
- Woodroffe M.N. (1995). Cytokine production in the central nervous system. *Neurology* 45, S6-S10.
- Yamada M., Ikeuchi T. and Hatanaka H. (1997). The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor. *Prog Neurobiol* 51, 19-37.
- Yamashiki M., Nishimura A. and Kosaka Y. (1992). Effects of methylcobalamin (vitamin B₁₂) on in vitro cytokine production of peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Lab Immunol* 37, 173-182.
- Yassin F., Rothenberg S.P., Rao S., Gordon M.M., Alpers D.H. and Quadros E.V. (2004). Identification of a 4-base deletion in the gene in inherited intrinsic factor deficiency. *Blood* 103, 1515-1517.
- Yuen E.C. and Mobley W.C. (1996). Therapeutic potential of neurotrophic factors for neurological disorders. *Ann Neurol* 40, 346-354.

9. Ringraziamenti

Gli Autori desiderano ringraziare tutti i collaboratori per l'aiuto dato nelle varie fasi di questa pluriennale ricerca sulla vitamina B₁₂. Gli Autori desiderano anche ringraziare il Sig. Tiziano Ferrari dell'Istituto di Patologia Generale per il prezioso aiuto dato nella stesura dei grafici e nella preparazione delle fotografie.

Indice

Editoriale	pag. 3
Presentazione	» 7
Ai lettori: storia di un libro	» 9
1. La vitamina B ₁₂	» 11
1.1. Cenni storici	» 11
1.2. Cenni sulla struttura chimica della vitamina B ₁₂	» 12
1.3. Il trasporto della vitamina B ₁₂ nel sangue, il suo assorbimento intestinale e la sua penetrazione endocellulare	» 13
1.4. Principali funzioni biochimiche della vitamina B ₁₂ e la sua distribuzione tissutale	» 18
1.5. Una nuova funzione non-coenzimatica della vitamina B ₁₂	» 20
2. Le cause del deficit di vitamina B ₁₂ nell'uomo	» 28
2.1. I difetti geneticamente determinati del trasporto e/o del metabolismo della Cbl o dei suoi coenzimi	» 28
2.2. Le malattie che causano una carenza acquisita di vitamina B ₁₂ nell'adulto	» 31
2.3. La carenza acquisita di Cbl in età pediatrica	» 32
3. Cenni sulle principali manifestazioni cliniche della malattie genetiche del trasporto e/o del metabolismo della Cbl o della sintesi dei suoi coenzimi	» 33
3.1. Le malattie del trasporto della Cbl	» 33
3.2. Le malattie del metabolismo della Cbl	» 34
4. Principali manifestazioni cliniche delle malattie da carenza acquisita di vitamina B ₁₂ nell'età adulta (cioè le cosiddette anemie perniciose e perniciosisiformi)	» 36
4.1. Le principali manifestazioni ematologiche.	» 36
4.2. Le principali manifestazioni neurologiche	» 38
4.3. Le principali manifestazioni a carico dell'apparato digerente ..	» 40

4.4. Le principali manifestazioni immunologiche » 40

5. Patogenesi delle principali manifestazioni biochimiche e della
sintomatologia clinica da carenza di vitamina B₁₂ » 41

5.1. La patogenesi della sintomatologia delle malattie geneticamente
determinate » 41

5.2. La patogenesi dei principali danni da carenza
acquisita di vitamina B₁₂ » 41

6. Possibile coinvolgimento della vitamina B₁₂ nella patogenesi di
alcune malattie neurologiche non classicamente collegabili alla carenza
di vitamina. » 44

6.1. La sclerosi multipla. » 44

6.2. La malattia di Alzheimer » 45

6.3. Le demenze » 45

7. Cenni sulle principali metodiche per la determinazione dei livelli
di Cbl nei principali liquidi fisiologici umani e l'accertamento di uno
stato carenziale in Cbl nell'uomo » 47

8. Bibliografia » 49

9. Ringraziamenti » 62

Indice » 63

Caleidoscopio

Italiano

... il futuro ha il cuore antico  MEDICAL SYSTEMS SpA

1. Rasso S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rasso S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rasso S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rasso S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rasso S.: *L'obesita'*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P., Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D., Girelli M.E., Zanatta G.P., Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La β -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico e fluoroimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rasso S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.
31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.

32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.
37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriagonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergo-acari*. Agosto '90.
55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
57. La Vecchia C. *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
58. La Vecchia C. *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterina nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T.: *Il piede diabetico*. Febbraio '92.
69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta*. Marzo '92.

70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Luglio '92.
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa*. Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin*. Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radio-nuclidi del Morbo di Graves-Basedow*. Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza*. Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio 94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptococchi beta emolitici di gruppo B (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodellamento osseo*. Aprile '94.
89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*. Settembre '94.
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: *Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*. Ottobre '94.
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: *Helicobacter pylori*. Novembre '94.
92. Parazzini F.: *L'epidemiologia della patologia ostetrica*. Febbraio '95.
93. Proietti A., Lanzafame P.: *Il virus di Epstein-Barr*. Marzo '95.
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: *Immunoflogosi nell'asma bronchiale*. Maggio '95.
95. Manduchi I.: *Steroidi*. Giugno '95.
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: *Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale*. Luglio '95.
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: *Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani*. Ottobre '95.
98. La Vecchia C., D'Avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: *Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*. Dicembre '95.
99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: *Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*. Gennaio '96.
100. Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: *Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*. Marzo '96.
101. Cogato I. Montanari E.: *La Sclerosi Multipla*. Aprile '96.
102. Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale*. Maggio '96.
103. Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.

104. Marcante R., Dalla Via L.: *Il virus respiratorio sinciziale*. Luglio '96.
105. Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: *Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tissutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative*. Ottobre '96.
106. Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: *Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale*. Novembre '96.
107. Morganti R.: *Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali*. Dicembre '96.
108. Andreoni S.: *Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti*. Gennaio '97.
109. Salemi A., Zoni R.: *Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi*. Febbraio '97.
110. Meisner M.: *Procalcitonina*. Marzo '97.
111. Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: *Malattie a trasmissione sessuale (2)*. Aprile '97.
112. Palleschi G., Moscone D., Compagnone D.: *Biosensori elettrochimici in Biomedicina*. Maggio '97.
113. Valtriani C., Hurle C.: *Citofluorimetria a flusso*. Giugno '97.
114. Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barucci P.: *Alcol e problemi correlati*. Settembre '97.
115. Piccinelli M.: *Depressione Maggiore Unipolare*. Ottobre '97.
116. Pepe M., Di Gregorio A.: *Le Tiroiditi*. Novembre '97.
117. Cairo G.: *La Ferritina*. Dicembre '97.
118. Bartoli E.: *Le glomerulonefriti acute*. Gennaio '98.
119. Bufi C., Tracanna M.: *Computerizzazione della gara di Laboratorio*. Febbraio '98.
120. National Academy of Clinical Biochemistry: *Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide*. Marzo '98.
121. Fava G., Rafanelli C., Savron G.: *L'ansia*. Aprile '98.
122. Cinco M.: *La Borreliosi di Lyme*. Maggio '98.
123. Giudice G.C.: *Agopuntura Cinese*. Giugno '98.
124. Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (I)*. Luglio '98.
125. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Basofili*. Settembre '98.
126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.: *Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo I*. Novembre '98.
127. Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (II)*. Dicembre '98.
128. Muzi P., Bologna M.: *Tecniche di immunoistochimica*. Gennaio '99.
129. Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: *Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivirali*. Febbraio '99.
130. Castello G., Silvestri I.: *Il linfocita quale dosimetro biologico*. Marzo '99.
131. Aiello V., Caselli M., Chiamenti C.M.: *Tumorigenesi gastrica Helicobacter pylori - correlata*. Aprile '99.
132. Messina B., Tirri G., Fraioli A., Grassi M., De Bernardi Di Valserra M.: *Medicina Termale e Malattie Reumatiche*. Maggio '99.
133. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Eosinofili*. Giugno '99.
134. Fusco A., Somma M.C.: *NSE (Enolasi Neurono-Specifica)*. Luglio '99.
135. Chieffi O., Bonferraro G., Fimiani R.: *La menopausa*. Settembre '99.
136. Giglio G., Aprea E., Romano A.: *Il Sistema Qualità nel Laboratorio di Analisi*. Ottobre '99.
137. Crotti D., Luzzi I., Piersimoni C.: *Infezioni intestinali da Campylobacter e microrganismi correlati*. Novembre '99.
138. Giovanella L.: *Tumori Neuroendocrini: Diagnosi e fisiopatologia clinica*. Dicembre '99.

139. Paladino M., Cerizza Tosoni T.: *Umanizzazione dei Servizi Sanitari: il Case Management*. Gennaio 2000.
140. La Vecchia C.: *Come evitare la malattia*. Febbraio 2000.
141. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Cellule dendritiche*. Marzo 2000.
142. Dammacco F.: *Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (I)*. Aprile 2000.
143. Dammacco F.: *Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (II)*. Maggio 2000.
144. Croce E., Olmi S.: *Videolaparoscopia*. Giugno 2000.
145. Martelli M., Ferraguti M.: *AllergoGest*. Settembre 2000.
146. Giannini G., De Luigi M.C., Bo A., Valbonesi M.: *TTP e sindromi correlate: nuovi orizzonti diagnostici e terapeutici*. Gennaio 2001.
147. Rassu S., Manca M.G., Pintus S., Cigni A.: *L'umanizzazione dei servizi sanitari*. Febbraio 2001.
148. Giovanella L.: *I tumori della tiroide*. Marzo 2001.
149. Dessì-Fulgheri P., Rappelli A.: *L'ipertensione arteriosa*. Aprile 2001.
150. The National Academy of Clinical Biochemistry: *Linee guida di laboratorio per lo screening, la diagnosi e il monitoraggio del danno epatico*. Settembre 2001.
151. Dominici R.: *Riflessioni su Scienza ed Etica*. Ottobre 2001.
152. Lenziardi M., Fiorini I.: *Linee guida per le malattie della tiroide*. Novembre 2001.
153. Fazio P.: *Dermatofiti e dermatofitosi*. Gennaio 2002.
154. Suriani R., Zanella D., Orso Giaccone G., Ceretta M., Caruso M.: *Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) Eziopatogenesi e Diagnostica Sierologica*. Febbraio 2002.
155. Trombetta C.: *Il Varicocele*. Marzo 2002.
156. Bologna M., Colorizio V., Meccia A., Paponetti B.: *Ambiente e polmone*. Aprile 2002.
157. Correale M., Paradiso A., Quaranta M.: *I Markers tumorali*. Maggio 2002.
158. Loviselli A., Mariotti S.: *La Sindrome da bassa T3*. Giugno 2002.
159. Suriani R., Mazzucco D., Venturini I., Mazzarello G., Zanella D., Orso Giaccone G.: *Helicobacter Pylori: stato dell'arte*. Ottobre 2002.
160. Canini S.: *Gli screening prenatali: marcatori biochimici, screening nel 1° e 2° trimestre di gravidanza e test integrato*. Novembre 2002.
161. Atzeni M.M., Masala A.: *La β -talassemia omozigote*. Dicembre 2002.
162. Di Serio F.: *Sindromi coronariche acute*. Gennaio 2003.
163. Muzi P., Bologna M.: *Il rischio di contaminazione biologica nel laboratorio biosanitario*. Febbraio 2003.
164. Magni P., Ruscica M., Verna R., Corsi M.M.: *Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche*. Marzo 2003.
165. Magrì G.: *Aspetti biochimici e legali nell'abuso alcolico*. Aprile 2003.
166. Rapporto dello Hastings Center: *Gli scopi della medicina: nuove priorità*. Maggio 2003.
167. Beelke M., Canovaro P., Ferrillo F.: *Il sonno e le sue alterazioni*. Giugno 2003.
168. Macchia V., Mariano A.: *Marcatori tumorali nel cancro della vescica*. Luglio 2003.
169. Miragliotta G., Barra Parisi G., De Sanctis A., Vinci E.: *La Tuberculosis Polmonare: Diagnostica di Laboratorio*. Agosto 2003.
170. Aebischer T.: *Il Comitato Internazionale della Croce Rossa ed il Diritto Internazionale Umanitario*. Settembre 2003.
171. Martino R., Frallicciardi A., Tortoriello R.: *Il manuale della sicurezza*. Ottobre 2003.

172. Canigiani S. e Volpini M.: *Infarto acuto del miocardio: biochimica del danno cellulare e marcatori di lesione*. Novembre 2003.
173. La Brocca A., Orso Giacone G., Zanella D., Ceretta M.: *Laboratorio e clinica delle principali affezioni tiroidee*. Dicembre 2003.
174. Savron G.: *Le Fobie*. Gennaio 2004.
175. Paganetto G.: *Evoluzione storica del rischio di patologie umane per contaminazione chimica ambientale*. Febbraio 2004.
176. Giovanella L.: *Iperparatiroidismo e tumori paratiroidei*. Marzo 2004.
177. Severino G., Del Zompo M.: *Farmacogenomica: realtà e prospettive per una "Medicina Personalizzata"*. Aprile 2004.
178. Arigliano P.L.: *Strategie di prevenzione dell'allergia al lattice nelle strutture sanitarie*. Maggio 2004.
179. Bruni A.: *Malattia di Alzheimer e Demenza Frototemporale*. Giugno 2004.
180. Perdelli F., Mazzarello G., Bassi A.M., Perfumo M., Dalleria M.: *Eziopatogenesi e diagnostica allergologica*. Luglio 2004.
181. Franzoni E., Gualandi P., Pellegrini G.: *I disturbi del comportamento alimentare*. Agosto 2004.
182. Grandi G., Peyron F.: *La toxoplasmosi congenita*. Settembre 2004.
183. Rocca D.L., Repetto B., Marchese A., Debbia E.A.: *Patogeni emergenti e resistenze batteriche*. Ottobre 2004.
184. Tosello F., Marsano H.: *Scientific English Handout*. Novembre 2004.
185. La Brocca A., Orso Giacone G., Zanella D.: *Ipertensione arteriosa secondaria: clinica e laboratorio*. Dicembre 2004.
186. Paganetto G.: *Malattie Neoplastiche: dalla Paleopatologia alle Fonti Storiche*. Gennaio 2005.
187. Savron G.: *La sindrome dai mille tic: il disturbo di Gilles de la Tourette*. Febbraio 2005.
188. Magrì G., Baghino E., Florida M., Ghiara F.: *Leishmania*. Marzo 2005.
189. Lucca U., Forloni G., Tiraboschi P., Quadri P., Tettamanti M., Pasina L.: *Invecchiamento, deterioramento cognitivo e malattia di Alzheimer*. Aprile 2005.
190. Volpe G., Delibato E., Orefice L., Palleschi G.: *Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili*. Maggio 2005.
191. Mazzarello M.G., Albalustri G., Audisio M., Perfumo M., L. Cremona G.: *Aerobiologia ed allergopatie*. Giugno 2005.
192. Scalabrino G., Veber D., Mutti E.: *Nuovi orizzonti biologici per la vitamina B₁₂*. Luglio 2005.



I volumi disponibili su Internet nel sito www.medicalsystems.it sono riportati in nero mentre in grigio quelli non ancora disponibili su Internet.

Inoltre sono disponibili un limitato numero di copie di alcuni numeri del Caleidoscopio che ormai sono "storiche". Qualora mancassero per completare la collana potete farne richiesta al collaboratore Medical Systems della Vostra zona. I numeri sono: Caleidoscopio 14, 18, 33, 40, 48, 49, 50, 54, 65, 68, 84, 100, 106, 118, 121, 126, 129, 130, 131, 132, 133, 134. I volumi verranno distribuiti sino ad esaurimento e non verranno ristampati se non in nuove edizioni.

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 23, numero 192

Direttore Responsabile

Sergio Rassu
Tel. mobile 338 2202502
E-mail: sergiorassu@libero.it

Progettazione e Realizzazione



Restless Architect
of Human Possibilities s.a.s.

Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Responsabile Ufficio Acquisti

Giusi Cunietti

Segretaria di Direzione

Maria Speranza Giola
Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti

Maria Grazia Papalia
Flavio Damarciasi

EDITORE

... il futuro ha il cuore antico  **MEDICAL SYSTEMS SpA**

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)

Tel. 010 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);
Telefax 010/8340310- 809070.

Internet URL: <http://www.medicalsystems.it>

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio Illustrato,
Caleidoscopio Letterario, Giornale della Associazione per l'Automazione del
Laboratorio, Guida Pratica Immulite[®], Journal of Clinical Ligand Assay, Pandora,
Tribuna Biologica e Medica.

Stampa

Tipolitografia Nuova ATA
Via Giovanni Torti, 32c/r - Genova
Tel. 010 513120 - Fax 010 503320 - info@nuovaata.com

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989
Iscrizione al Registro degli Operatori di Comunicazione (ROC) n° 1188

Finito di stampare: Luglio 2005
Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e
scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento
professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano