

# ACIDO FOLICO: RISCHIO-BENEFICIO DI INTERVENTI DI FORTIFICAZIONE DEGLI ALIMENTI

Francesca Baldi (a), Fabio Galvano (b), Alberto Mantovani (a), Valentina Pizzamiglio (c), Vincenzo Pontieri (d), Stefania Ruggeri (e)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Scienze del Farmaco, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Catania*

(c) *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna*

(d) *Servizio Igiene degli Alimenti e Nutrizione, Dipartimento di Prevenzione, ASL Caserta, Caserta*

(e) *Area Scienze degli Alimenti, Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura, Istituto Nazionale di Ricerca per Alimenti e la Nutrizione, Roma*

## Introduzione

Gli interventi di prevenzione primaria basati sulla fortificazione di alimenti con nutrienti essenziali (oligoelementi, vitamine), vanno valutati anche per i possibili rischi derivanti da un'eccessiva assunzione di tali nutrienti in gruppi di popolazione vulnerabili.

Forti evidenze scientifiche hanno dimostrato che l'Acido Folico (AF) assunto come supplemento epoca periconcezionale gioca un ruolo primario nella riduzione dell'incidenza di malformazioni congenite, principalmente dei Difetti del Tubo Neurale (DTN). Per un approfondimento dei diversi aspetti dell'AF, soprattutto riguardo alla prevenzione dei difetti congeniti (*vedi*: Area tematica ISS dedicata al Network Italiano Acido Folico: [www.iss.it/cnmr/acid](http://www.iss.it/cnmr/acid)) (1-3). Paesi come gli Stati Uniti, Canada e circa altri 50 Paesi extraeuropei hanno adottato la fortificazione obbligatoria delle farine di frumento con l'intento di migliorare lo stato di nutrizione della popolazione e ridurre l'incidenza dei DTN e altre malformazioni congenite.

Il documento del gruppo di lavoro EFSA (*European Food Safety Authority*) sulla fortificazione degli alimenti con AF ha evidenziato, quale aspetto particolarmente importante, la possibile diversa distribuzione di rischi e benefici in diverse fasce di popolazione (4). Nelle sue valutazioni il comitato degli esperti dell'EFSA si è basato sul livello di apporto massimo tollerabile (*Upper Level*, UL) di 1 mg al giorno di folati totali (folati naturali e AF) definito nel 2000 dal *Scientific Committee on Food* (5). Lo UL è stato definito tenendo conto della possibilità che un'alta assunzione di AF, in modo particolare negli anziani, potrebbe mascherare gli effetti ematologici di una carenza di vitamina B12 con la conseguenza che la patologia venga riconosciuta più tardivamente in forma più severa con elevati danni neurologici. Per contro, lo UL è stato definito prima della discussione su una eventuale promozione tumorale indotta da un eccesso di AF, che è stata il fulcro della susseguente valutazione rischio-beneficio dell'AF.

## I folati come nutrienti essenziali

I termini "acido folico" e "folati" derivano dal latino "folium" poiché identificati per la prima volta negli spinaci e in altri vegetali a foglia. Spesso i termini AF e folati vengono erroneamente usati come sinonimi, anche se indicano composti chimici diversi.

L'AF o acido pteroilmonoglutammico, o vitamina B9, è la molecola generata dalla coniugazione di residui di acido glutammico con acido pteroico, (anello pteridinico legato all'acido paraminobenzoico). Quasi del tutto assente negli alimenti, l'AF è un composto di sintesi, utilizzato per la fortificazione alimentare e nelle supplementazioni vitaminiche in virtù della sua maggiore stabilità chimica.

Il termine folati genericamente indica diversi composti, naturalmente presenti negli alimenti soprattutto di origine vegetale (6), di formula chimica simile all'AF, con attività vitaminica analoga, in quanto aventi funzione di trasferimento dell'unità monocarboniosa nel metabolismo degli acidi nucleici e degli aminoacidi. I folati sono nutrienti essenziali poiché devono essere introdotti con la dieta, non essendo l'essere umano in grado di sintetizzare l'acido paraminobenzoico, né di legare i residui di glutammato all'acido pteroico. I folati prodotti dalla flora batterica intestinale non sono disponibili all'assorbimento. Sono composti poliglutammati, cioè possiedono diverse molecole di acido glutammico e per essere assorbiti devono essere idrolizzati a monoglutammati ad opera dell'enzima pteroilpoliglutammati idrolasi, presente sulla membrana baso-laterale degli enterociti del tenue. L'assorbimento avviene prevalentemente nel digiuno con un meccanismo di trasporto attivo a concentrazioni fisiologiche e di trasporto passivo, maggiore a pH lievemente acido, ad alte concentrazioni.

All'interno dell'enterocita entrambe le forme sono metabolizzate dalla diidrofolato reductasi formando L-5-metiltetraidrofolato (5-MTHF), che essendo l'unica forma di folato circolante perviene ai tessuti periferici e svolge le funzioni metaboliche. Il tetraidrofolato ha un importante ruolo nella biosintesi delle purine e delle pirimidine nonché nel ciclo della metilazione, mediando reazioni che portano alla formazione di metionina. Dal tetraidrofolato originano infatti i coenzimi folici, tra loro interconvertibili e fattori chiave nel metabolismo degli aminoacidi e nella sintesi degli acidi nucleici. Ne consegue che gli effetti di una carenza di folati sono avvertiti principalmente nei tessuti in fase proliferativa e di differenziazione, come nell'embriogenesi e nell'emopoiesi.

Un'ultima forma è il sale calcico di MTHF che pur avendo biodisponibilità e attività fisiologiche sovrapponibili a quelle dell'AF, presenta rispetto ad esso il vantaggio di non mascherare potenziali carenze di vitamina B12 e di non subire interferenze dai farmaci in grado di inibire la diidrofolato reductasi (7). Al momento l'elevato costo ostacola il suo utilizzo sia nella supplementazione che nella fortificazione.

## **AF: Rischio di carenza e rischio di eccesso**

La carenza di folati può avvenire per apporto inadeguato con la dieta, diminuito assorbimento, fabbisogno, presenza del diabete di tipo I, trattamento con alcuni farmaci (es. anticonvulsivanti, metotrexate, contraccettivi orali), polimorfismi genetici. Le principali conseguenze di una prolungata carenza di folati sono lo sviluppo di anemia megaloblastica e l'iperomocisteinemia (8).

L'omocisteina è un aminoacido solforato che costituisce un prodotto intermedio del metabolismo dell'aminoacido essenziale metionina. Tale processo prevede la riconversione dell'omocisteina in metionina da parte dell'enzima metionina-sintetasi (vitamina B12-dipendente) che utilizza, come donatore di metile, il 5-metiltetraidrofolato. Un'altra via metabolica è quella che prevede l'unione di una molecola di omocisteina con una di serina, a formare cistationina, reazione catalizzata dall'enzima cistationinab-sintetasi (vitamina B6-dipendente). L'omocisteina plasmatica riflette il bilancio tra produzione e utilizzazione intracellulare: un aumento dei livelli plasmatici di omocisteina è potenzialmente associato con una maggiore incidenza di patologie cardiovascolari e neurologiche, tuttavia non è ancora

chiaro se l'iperomocisteinemia sia un fattore di rischio o, più semplicemente, un biomarcatore di queste patologie (9).

L'effetto benefico dell'AF più noto è la riduzione del rischio di malformazioni congenite. L'assunzione di AF prima del concepimento e durante le prime fasi della gravidanza gioca un ruolo importante nella prevenzione dei DTN e altre malformazioni, quali le anomalie cardiache, patologie del tratto urinario, oro-facciali e degli arti. L'effetto è particolarmente evidente nelle popolazioni con alta incidenza di DTN. Il Network Italiano Promozione Acido Folico, coordinato dal Centro Nazionale Malattie Rare dell'Istituto Superiore di Sanità, ha elaborato e diffuso una raccomandazione per la supplementazione periconcezionale con AF: "Si raccomanda che le donne che programmano una gravidanza, o che non ne escludono attivamente la possibilità, assumano regolarmente almeno 0,4 mg al giorno di acido folico per ridurre il rischio di difetti congeniti. È fondamentale che l'assunzione inizi almeno un mese prima del concepimento e continui per tutto il primo trimestre di gravidanza" (10).

Considerando che una buona percentuale delle gravidanze non viene pianificata, molte nazioni hanno intrapreso campagne di fortificazione delle farine di cereali con AF in modo da aumentarne l'apporto quotidiano. La fortificazione obbligatoria, presente in molti Paesi extraeuropei, ad oggi non è stata introdotta in nessuno Stato della Comunità Europea.

Infatti, mentre i benefici apportati dall'AF nel ridurre il rischio di DTN e altre malformazioni prevenibili sono indiscussi nei Paesi in cui è attiva la *mandatory fortification*, studi *in vitro* e su animali da laboratorio suggeriscono una relazione tra un elevato consumo di AF e promozione maligna di lesioni benigne pre-cancerose, del tratto colon-rettale. I risultati controversi degli studi sull'uomo non permettono ancora conclusioni sul rischio di promozione tumorale. L'EFSA, alla luce di tali incertezze, ha sottolineato la necessità di ulteriori studi. Un recente studio ha mostrato come sia la carenza che l'eccesso di AF alterino i meccanismi immunitari nell'epitelio del colon umano, effetto potenzialmente correlato alla promozione tumorale (11). Uno studio interessante svolto negli Stati Uniti ha evidenziato in una coorte di bambini di 1-8 anni di età, una bassa incidenza di carenza di folati, e alto rischio di superamento dell'UL, soprattutto in relazione al consumo concomitante di supplementi vitaminici e alimenti fortificati (12), suggerendo la necessità di ulteriori indagini sui possibili effetti avversi di un eccesso di AF in bambini e adolescenti.

La valutazione degli effetti benefici dell'AF andrebbe inoltre riconsiderata nel contesto più ampio della dieta e degli stili di vita, congiuntamente all'azione di altri nutrienti coinvolti nei maggiori processi di metilazione e, quindi, del metabolismo dell'AF stesso.

## Interazioni con altre sostanze presenti negli alimenti

Il metabolismo intracellulare aminoacidico e quello nucleotidico (*One-carbon metabolism*) sono mediati da numerosi nutrienti essenziali, in particolare dall'AF, ma anche dalle vitamine B12, B6, B2, nonché dall'apporto di metionina; ne consegue l'importanza dello status ottimale dei fattori dietetici i quali modulano il corretto utilizzo nell'organismo e non solo il corretto apporto di AF.

Interferenze nel metabolismo di unità monocarboniose (*one-carbon metabolism*), causate da squilibri nutrizionali o polimorfismi genetici degli enzimi coinvolti, possono risultare in una compromissione dei processi di sintesi/riparazione del DNA nonché in una espressione genica aberrante (13). Inoltre, la biodisponibilità dei folati potrebbe essere influenzata dallo status dello zinco in quanto gli enzimi sono zinco-dipendenti. Tuttavia, i meccanismi e le conseguenze derivanti dalla possibile interazione fra zinco e folati e/o AF non sono ancora stati chiariti (14). Recenti dati indicano anche l'importanza delle interazioni fra AF, vitamina B12 e acido

docosaesaenoico nella regolazione della metilazione del DNA durante lo sviluppo intrauterino (15, 16). Alcuni alimenti possono modulare la biodisponibilità dei folati, ad esempio il consumo di latte bovino la aumenta (17), mentre le catechine contenute nel tè verde, inibendo l'attività dell'enzima diidrofolato reduttasi, riducono la sintesi della forma attiva circolante (18).

Infine, il fabbisogno di AF potrebbe essere aumentato dalla presenza di contaminanti alimentari. L'AF velocizza i processi di metilazione che sono alla base della detossificazione dell'arsenico, soprattutto se somministrato assieme alla vitamina B12 (19); inoltre quest'ultima facilita il primo passo della metilazione dell'arsenico in soggetti con sufficiente apporto di folati (20). Le fumonisine, micotossine che contaminano i cereali soprattutto il mais, possono interferire con l'assorbimento dei folati e aumentare il rischio di DTN (21).

## **Nuove evidenze e implicazioni sulla biodisponibilità dei folati**

La biodisponibilità dei folati dipende da diversi fattori tra cui la matrice alimentare, la loro ridotta stabilità, la presenza di alcuni costituenti della dieta che potrebbero aumentarne la stabilità durante la digestione ed, infine, il metodo di cottura e conservazione (22). La biodisponibilità dipende inoltre da fattori individuali, stati fisiologici dell'organismo (gravidanza, allattamento) e dai genotipi.

Dall'analisi e dalla revisione degli studi condotti tra gli anni '80 e gli anni '90 si era giunti alla conclusione che la biodisponibilità dei folati provenienti da fonti alimentari poteva essere stimata al 50% rispetto a quella dell'AF sintetico e che quella dell'AF aggiunto agli alimenti fortificati fosse circa dell'85% (23, 24), mentre l'AF presente nei supplementi vitaminici si dimostrava in tutti gli studi completamente biodisponibile. Sulla base di queste considerazioni nel 1998 l'*Institute of Medicine* decise di adottare come unità di misura per l'indicazione dei livelli di assunzione raccomandati (25) il sistema dei folati equivalenti nel quale: 1 µg di folati da fonti alimentari corrisponde ad 1 µg di folati equivalenti, 1 µg di AF presente come fortificante negli alimenti ad 1,7 µg di Folati Equivalenti e 1 µg di AF da supplementi a 2 µg di folati equivalenti. In seguito alle raccomandazioni statunitensi, altri documenti come i D-A-CH redatti per la Germania, Austria e Svizzera (26), le raccomandazioni dei Paesi Nord europei (27) e il documento europeo WHO/FAO (28) hanno deciso di esprimere le raccomandazioni in termini di folati equivalenti.

Recentemente, però, l'uso dei folati equivalenti è oggetto di discussione: alcuni trial clinici hanno dimostrato che diete ricche in alimenti fonti di folati quali frutta e verdura, sono in grado di aumentare la folatemia plasmatica ed eritrocitaria e di ridurre l'omocisteinemia plasmatica con la stessa efficacia del supplemento vitaminico a base di AF (29-31). Inoltre, altri lavori scientifici (32, 33) hanno evidenziato che, nei Paesi Bassi, le donne che seguono un'alimentazione di tipo "mediterraneo (basata principalmente sul consumo di frutta, verdura, cereali integrali e pesce) hanno un rischio ridotto per i DTN e malformazioni cardiache.

Da questi studi si evince che il concetto di biodisponibilità dei folati non può essere limitato alla valutazione degli effetti di un singolo alimento, bensì all'intera dieta, sistema più complesso che può modificare, anche in modo determinante, la biodisponibilità di questi composti (18).

I nutrizionisti e i medici italiani sono orientati a non adottare il concetto di folati equivalenti nell'espressione di livelli di assunzione raccomandati in folati, allo scopo di promuovere l'apporto di folati attraverso fonti naturali, limitando l'uso degli alimenti fortificati e dei supplementi vitaminici a particolari condizioni fisiologiche o in vista di una gravidanza.

## Effetti benefici e effetti avversi nelle diverse fasce di popolazione di dosi elevate di AF

I folati sono nutrienti essenziali alle funzioni primarie dell'organismo e la loro carenza può portare a serie complicazioni.

In questa sezione consideriamo l'evidenza di effetti protettivi dell'AF nei confronti del rischio di alcune patologie e dei possibili effetti avversi nel caso di sovradosaggio. Mentre l'assunzione di AF nelle dosi e nei tempi raccomandati per le donne in età fertile porta a benefici inconfutabili, alte dosi di AF al di sopra dell'UL, soprattutto in determinate fasce di popolazione, non sembrano sortire alcun beneficio aggiuntivo; anzi, l'esposizione prolungata porta alla comparsa di AF non metabolizzato nel plasma associato all'aumento di rischio di altre patologie che si pensava potessero essere prevenute se non addirittura curate con la supplementazione di AF.

La validità della supplementazione periconcezionale con AF per la riduzione dei DTN è indiscussa; l'effetto sulla riduzione di altre malformazioni è meno evidente, ma sostenuto comunque da evidenze scientifiche. La supplementazione con acido folico dove è presente la fortificazione non offre ulteriori benefici nella riduzione di incidenza della spina bifida, mentre l'assunzione di folati naturali della dieta offre benefici aggiuntivi (34). Gli eventuali effetti protettivi dell'AF a lungo termine sullo sviluppo possono rappresentare un nuovo campo di indagine: un recente studio sperimentale sui ratti ha mostrato come la supplementazione con AF in gravidanza può avere effetti positivi sul metabolismo di glucidi e grassi e modula la espressione di recettori nucleari coinvolti nel metabolismo energetico (PPAR e LXR) nel fegato. Gli effetti osservati sono comunque modulati dalla dieta post-natale, ma non vi è una chiara correlazione fra la espressione genica e il fenotipo (35).

Appaiono ancora deboli le evidenze epidemiologiche sui possibili effetti protettivi di AF nei confronti di patologie cronico-degenerative dell'adulto quali quelle cardiovascolari (*CardioVascular Disease*, CVD), i deficit dei processi cognitivi legati all'età, la depressione, le neuropatie e i tumori. Numerosi studi osservazionali hanno associato una dieta basata sul consumo prevalente di alimenti di origine vegetale con un ridotto rischio di CVD e di alcuni tumori quali il cancro del colon-retto. Sulla base di queste evidenze epidemiologiche, diversi studi randomizzati e controllati sono stati avviati per valutare l'effetto delle vitamine del gruppo B, tra cui l'AF, e rischio di tumori. L'AF sembra essere inversamente associato al rischio di cancro del colon-retto solo nei primi stadi pre-adenoma (36). Un effetto protettivo dei folati nella dieta è stato osservato anche per il carcinoma pancreatico limitatamente, però, ai gruppi di popolazione con uno status insufficiente (37).

Data la capacità dell'AF di abbassare i livelli ematici di omocisteina è stata a lungo ipotizzata una sua possibile azione benefica nei confronti di varie patologie croniche. Tuttavia la riduzione di omocisteinemia e la maggiore disponibilità di composti metilici forniti da supplementi vitaminici non sembra essere sufficiente per influenzare la metilazione del DNA genomico (38). Pertanto, la riduzione dell'omocisteinemia sembra essere un biomarcatore piuttosto che un fattore diretto di riduzione del rischio.

Nei Paesi come USA e Canada, la fortificazione obbligatoria e facoltativa con AF ha migliorato lo stato di nutrizione per i folati di una grande parte della popolazione. Secondo i dati del *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), circa il 40% degli anziani ( $\geq 60$  anni) negli Stati Uniti presenta AF non metabolizzato nel plasma, che persiste anche dopo il digiuno, soprattutto in soggetti con concomitante assunzione di supplementi e cibi fortificati. Data la possibilità che l'eccessiva esposizione all'AF possa essere correlata a rischio di promozione tumorale, il monitoraggio dei livelli di AF non metabolizzato è auspicabile nelle

popolazioni soggette a fortificazione obbligatoria (39). Anche in un Paese europeo come l'Irlanda ove la fortificazione obbligatoria non è presente ma vi è un'alta diffusione di integratori e alimenti fortificati, la presenza di AF non metabolizzato nella popolazione over 60 è pari al 94% rappresentando in media l'1.3% dei folati plasmatici totali (40).

A tale proposito, diversi studi che hanno valutato gli effetti della supplementazione hanno contribuito all'aumento delle incertezze riguardanti l'assunzione di dosi elevate di AF: uno studio (41) condotto su circa 7000 cardiopatici ha mostrato come nel gruppo che ha ricevuto un'integrazione di AF e vitamina B12 (a dosi, rispettivamente, di 0,8 mg/d e 0,4 mg/d) in associazione con vitamina B6 o B12 è stato osservato un incremento dell'incidenza e della mortalità in particolare per tumori ematologici e polmonari, e nessun beneficio a carico della riduzione di CVD.

Lo AF sembra essere inversamente associato ad un aumento del rischio cancro del colon-retto nel caso di lesioni precancerose pre-esistenti, suggerendo così un duplice ruolo dell'AF dipendente dalla dose e dal tempo in cui è somministrato (36). I dati più preoccupanti sul possibile rischio di eccesso di AF provengono da studi riguardanti popolazioni esposte a fortificazione obbligatoria, soprattutto se concomitante con l'uso di integratori vitaminici capaci di modificare l'associazione tra geni implicati nel metabolismo dei folati e rischio di cancro colon-rettale (42). L'associazione tra eccesso di AF e crescita della cellula tumorale è biologicamente plausibile, infatti, una classe di agenti chemioterapici, servono ad inibire il metabolismo dei folati (43). Un'ipotesi di grande interesse è che l'eccesso di AF interferisca con l'immunità dell'organismo nei confronti dei processi tumorali: in donne in menopausa i livelli plasmatici di AF non metabolizzato sono inversamente associati all'attività delle cellule Natural Killer (44). Sia l'eccesso che la carenza di AF possono alterare i processi immunitari nell'epitelio del colon (11).

Una seria lacuna conoscitiva riguarda i possibili effetti dell'eccesso di AF nell'organismo in via di sviluppo. AF non metabolizzato è stato trovato anche in campioni di sangue del cordone ombelicale, sebbene non sembrerebbe accumularsi nel feto (46). Negli USA, AF non metabolizzato è regolarmente presente anche nel latte materno, rappresentando circa l'8% dei folati totali (47). Nel ratto, un'alta esposizione intrauterina associata all'esposizione attraverso la dieta nello svezzamento aumenta il rischio di tumori mammari nella prole; tale promozione tumorale potrebbe essere mediata in parte dall'alterazione della metilazione del DNA e dell'attività della metiltrasferasi (48). Anche se, date le differenze nel metabolismo, è difficile estrapolare direttamente questi dati all'essere umano (49).

Il rapporto fra folati e cancro mammario è oggetto di crescente interesse, ma gli studi disponibili non consentono ancora di raggiungere conclusioni. Tali studi sono stati effettuati in popolazioni diverse dal punto di vista genetico, degli stili alimentari e dell'assunzione di alimenti fortificati (Cina, Giappone, USA, Scandinavia); mentre si è data attenzione alla tipizzazione clinica (tumore pre- o post-menopausa, istotipo), purtroppo l'assunzione di "folati" è stata misurata generalmente in modo indiretto tramite questionario. Fra gli studi effettuati in Europa, in due consistenti coorti svedesi è stato osservato un effetto protettivo a lungo termine di alte assunzioni di folati nella dieta verso le assunzioni basse, al limite del fabbisogno; tuttavia i risultati erano parzialmente contraddittori riguardo all'istotipo, rispettivamente positivo (50) e negativo per l'espressione dei recettori estrogeni (51). Per contro un modesto, ma significativo, incremento del rischio (+27%) è stato osservato in una coorte di più di 20.000 donne danesi in menopausa, limitatamente ai tumori positivi per i recettori estrogeni e del progesterone (52); interessanti i risultati di uno studio caso-controllo svedese, in cui i folati plasmatici totali sono associati ad un maggiore rischio di tumore, limitatamente al tipo positivo per il recettore estrogeno beta (53). Purtroppo, sinora nessuno studio ha valutato un eventuale rischio di cancro mammario in relazione ai livelli di AF libero. Tuttavia, gli studi disponibili indicano che il

tumore mammario va ulteriormente indagato come patologia potenzialmente importante per la valutazione rischio-beneficio di AF.

Un importante aspetto della valutazione dei possibili rischi derivanti da AF non metabolizzato è l'incidenza dei polimorfismi dei geni del metabolismo dei folati quali la metilene-tetraidrofolato reduttasi (MTHFR), la diidrofolato reduttasi (DHFR) e il trasportatore dei folati (*Reduced Folate Carrier*, RFC). È possibile che l'AF non metabolizzato possa accumularsi, in particolare nei soggetti con comuni polimorfismi genetici associati a ridotta attività della DHFR. Infatti, nell'essere umano la conversione di AF in THF, che avviene nel fegato ad opera della DHFR, è un processo lento: i possibili benefici derivanti dall'assunzione di dosi elevate di AF potrebbero essere limitati dalla saturazione della DHFR, soprattutto in soggetti con ridotta attività enzimatica (49, 54).

In fasce di popolazione diverse dalle donne in età riproduttiva, ovvero bambini, uomini, donne oltre l'età fertile e anziani, in assenza di condizioni particolari (carenze di origine alimentare e/o genetica, stili di vita o esposizioni ambientali che ne aumentano il fabbisogno), l'assunzione di alti livelli di AF (supplementazione, alimenti fortificati) non ha mostrato una chiara evidenza di effetti benefici per la prevenzione primaria di malattie croniche, mentre esistono segnali preoccupanti sulla sua capacità di "nutrire" e/o "promuovere" lesioni benigne preesistenti.

Le attuali evidenze scientifiche non sono ancora in grado di chiarire i complessi meccanismi di azione dell'AF sia per quanto riguarda gli effetti protettivi che quelli avversi; il ruolo duale dell'AF sembra essere legato a tre variabili: la dose, la durata e la finestra dell'esposizione e le caratteristiche dei gruppi e/o dei soggetti esposti.

## Livelli di folati nella popolazione italiana

Dall'analisi della bibliografia più recente emerge una forte carenza di dati sullo stato di nutrizione per i folati della popolazione italiana. I valori riportati da tutti gli studi non soddisfano la raccomandazione WHO/CDC (28) per gli adulti in cui viene indicato un livello medio di 400 µg/pro capite/die.

Attualmente è in corso la valutazione dei livelli di assunzione sulla base dell'indagine INRAN-SCAI (Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione – Studio sui Consumi Alimentari in Italia) riguardante i consumi alimentari in Italia (55) e sulla base di un nuovo database con dati analitici sul contenuto in folati negli alimenti più frequentemente consumati in Italia, tipici delle nostre produzioni e presenti sui nostri mercati. Questo studio fornirà dati sull'assunzione non solo di folati naturali dagli alimenti, ma dell'AF da supplementi e da alimenti fortificati. Dati preliminari dimostrano che il contributo all'apporto medio in folati da parte degli alimenti fortificati e degli integratori vitaminici nella popolazione italiana è molto ridotto (secondo i dati preliminari non ancora pubblicati di un'indagine del CRSA-INRAN in corso).

Tutti gli studi in Italia condotti su gruppi di popolazione riportano livelli medi di assunzione inferiori a quelli raccomandati per le donne in età fertile (56, 57). Lo studio INCHIANTI (58), condotto in una coorte piuttosto ampia (> 1300 soggetti), riporta livelli medi di assunzione di folati piuttosto bassi (254 µg/die) che si riflettono in bassi livelli di folati circolanti, particolarmente nei soggetti omozigoti per la variante TT del gene della MTHFR 677, che quindi costituiscono una sottopopolazione particolarmente a rischio di carenza. Il polimorfismo MTHFR-TT677, che rende meno efficiente l'enzima, ha una frequenza intorno al 20% (59).

Sarebbe interessante verificare possibili stati subcarenziali di zinco, B6 e B12 nella popolazione anziana italiana, in quanto elementi importanti in relazione a possibili strategie di promozione nutrizionale. In questo ambito andrebbero considerate le caratteristiche demografiche della popolazione italiana con bassissima natalità e crescente percentuale di popolazione anziana (60); inoltre in Italia la popolazione è composta ormai anche da consistenti gruppi di immigrati di provenienze molto diverse risultanti in stili alimentari e suscettibilità diverse. In genere la popolazione immigrata, almeno quella di prima generazione, presenta uno status socio-economico più basso e una minore conoscenza delle strategie di prevenzione.

Un altro aspetto da approfondire è l'aumento dell'uso di integratori vitaminici che interessa soprattutto donne di livello socio-culturale medio alto, persone che praticano assiduamente attività sportiva e persone con stili alimentari salutisti; è interessante notare come l'uso di integratori sia più presente in gruppi di popolazione verosimilmente con minore rischio di stati carenziali.

## **Strategie alternative alla fortificazione obbligatoria: arricchimento e biofortificazione degli alimenti**

Alla luce delle tante incertezze sollevate dalle evidenze scientifiche (4) la fortificazione obbligatoria delle farine non è al momento una strategia praticabile in Europa e in Italia. Tuttavia anche la promozione dell'uso volontario di alimenti fortificati e di integratori ha le stesse controindicazioni della fortificazione obbligatoria, forse con rischi anche maggiori di superare l'UL di AF in alcuni gruppi.

Alcune alternative volte ad incrementare l'assunzione di folati sono l'arricchimento degli alimenti attraverso la mangimistica, intervenendo su matrici alimentari idonee quali latte e uova, e la biofortificazione degli alimenti.

È necessario fare una distinzione tra fortificazione, arricchimento e biofortificazione di alimenti:

- fortificare significa aggiungere nutrienti non presenti (o presenti in quantità modeste) in origine in quantità maggiori rispetto a quelle presenti prima dei processi di lavorazione/raffinamento: un esempio è il sale iodato, il cui uso è promosso in Italia (61);
- arricchire vuol dire ripristinare i nutrienti che erano presenti in origine (e nelle stesse quantità) che sono andati persi durante i processi di lavorazione.
- biofortificare significa ingegnerizzare piante edibili per aumentarne i nutrienti presenti in origine.

L'arricchimento è una strategia attraente ma debbono venire considerate alcune problematiche quali l'identificazione di alimenti carrier o matrici alimentari in grado di aumentarne la biodisponibilità e adeguati per consumo, ovvero in grado di garantire l'apporto necessario a coprire il fabbisogno; l'identificazione della tipologia del consumatore degli alimenti ovvero arricchire alimenti che siano abitualmente consumati dai gruppi di popolazione più a rischio di carenza: ad esempio negli USA la fortificazione della farina di grano non ha raggiunto efficacemente la popolazione di origine latino-americana in quanto consumatrice soprattutto di farina di mais (62). In ultimo la promozione degli alimenti fortificati o arricchiti potrebbe essere fuorviante, indicandoli come "sostituti" di una dieta sana ed equilibrata.

La supplementazione con AF dei mangimi porta ad un modesto arricchimento del contenuto di folati totali nelle uova senza presentare il rischio di superare l'UL (63). Tuttavia il beneficio aggiuntivo che si ottiene è minimo: 25 µg die pari ad 1/16 della dose raccomandata alle donne che non escludono attivamente la gravidanza (64).

È ben nota la capacità di alcuni ceppi di batteri lattici (lattobacilli) di sintetizzare vitamine idrosolubili tra cui folati, riboflavina e vitamina B12; la possibile elaborazione di cibi funzionali fermentati, ottenuti con i lattobacilli aumentando il contenuto e la biodisponibilità delle vitamine del gruppo B, potrebbe rappresentare una alternativa alla fortificazione (65).

Alcuni ceppi producono 5-MTHF, forma biologicamente attiva che non maschera la carenza di vitamina B12 e non è influenzata da eventuali polimorfismi genetici dell'enzima 5MTHF riduttasi; ad esempio, lo *Streptococcus thermophilus* da cui si può ottenere uno yogurt con un contenuto di 5-MTHF sei volte maggiore rispetto al controllo dopo 12 ore di fermentazione (66). Inoltre i probiotici sono già largamente utilizzati per i loro benefici sulla flora batterica intestinale, il sistema immunitario e la riduzione del colesterolo. La selezione e la combinazione dei ceppi microbici è fondamentale perché, mentre alcune specie producono folati altre (come il *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*) sono consumatrici di folati. Una molecola di folato contiene una parte di pterina, originatasi dal 6-idrossimetil-7,8-dihydropterin pirofosfato (DHPPP), legata al para-aminobenzoico (pABA, vitamina B10). Quindi la biosintesi de novo richiede entrambi i precursori, DHPPP e pABA. Essendo in grado di produrre DHPPP, diversi lattobacilli (es. *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. helveticus*, e *L. fermentum*) potrebbero essere considerati come potenziali produttori di folati se coltivati in presenza di pABA (67). La limitazione relativa alla presenza di pABA potrebbe precludere l'utilizzo dei lattobacilli per la produzione di cibi funzionali. Ratti alimentati con bifidobatteri produttori di folati hanno mostrato un aumento dei livelli plasmatici di folato, confermando che la vitamina viene prodotta in vivo e assorbita. Uno studio sull'uomo con gli stessi ceppi ha mostrato un significativo aumento della concentrazione di folati nelle feci, indicando un aumento della produzione intestinale (68); tuttavia mancano ancora dati su un eventuale effetto sul livello plasmatico.

Una ulteriore alternativa potrebbe essere fornita dalla biofortificazione, ovvero il potenziamento di un alimento già di per sé ricco di folati. Un esempio può essere rappresentato dagli spinaci che presentano notevoli differenze tra le diverse cultivar (69). L'uso della genomica per creare cultivar arricchite in folati presenta ad oggi molte incognite soprattutto in relazione ai processi di omeostasi, catabolismo, trasporto di membrana e stoccaggio vacuolare. La comprensione di tali processi, che richiedono approfondimenti di biochimica e -omiche, dovrebbe portare a miglioramenti nelle attuali strategie di biofortificazione (70).

Infine, la promozione di corretti stili alimentari deve essere necessariamente integrata con la conoscenza di metodi di preparazione dei cibi volti a preservarne i benefici nutrizionali: la perdita di folati, che in casi estremi può arrivare sino al 99%, dipende dal tipo di alimento, dal metodo e dalla durata di cottura (71). Ad esempio la cottura al vapore, anche se prolungata, è la più indicata al fine di ridurre le perdite di folati in spinaci e broccoli (72). Essendo i folati idrosolubili si raccomanda di bollire in poca acqua e per un tempo ridotto (73).

## Conclusioni e raccomandazioni

Nell'attesa di ulteriori sviluppi della ricerca nel campo dell'innovazione alimentare e agronomica, è indispensabile continuare a promuovere la supplementazione periconcezionale dell'acido folico, principalmente nelle fasce di popolazione più esposte a carenze derivanti da abitudini alimentari e status socio-economico disagiato.

La promozione di un'adeguata assunzione di folati deve avvenire nel contesto del miglioramento degli stili alimentari e presuppone l'educazione del cittadino e degli operatori della ristorazione collettiva. È importante diffondere la conoscenza di metodi di cottura e conservazione volti a preservare al meglio il contenuto di folati negli alimenti.

Le campagne di educazione alimentare dovranno essere mirate sia alle donne in età fertile, che alla popolazione generale, con particolare riguardo ai bambini: occorre aumentare il consumo di alimenti di origine vegetale, attraverso la proposta di modelli semplici e pratici da adottare, che siano facilmente perseguibili all'interno del nostro stile di vita, che ci riportino ad un legame con il nostro territorio, e a riavvicinarci ad alla tradizione culturale della "Dieta Mediterranea".

## Bibliografia

1. Pierini A, Bianchi F, Salerno P, Taruscio D. (Ed.). *Registro Nazionale Malattie Rare: malformazioni congenite e acido folico*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2006. (Rapporti ISTISAN 06/34).
2. Salerno P, Bianchi F, Pierini A, Baldi F, Carbone P, Mantovani A, Taruscio D. Folic acid and congenital malformation: scientific evidence and public health strategies. *Ann Ig* 2008;20(6):519-30.
3. Taruscio D, Carbone P, Granata O, Baldi F, Mantovani A. Folic acid and primary prevention of birth defects. *Biofactors* 2011;37(4):280-4.
4. EFSA (European Food Safety Authority). *ESCO Report on analysis of risks and benefits of fortification of food with folic acid*. Parma: EFSA; 2009. Disponibile all'indirizzo: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/3e.pdf>; ultima consultazione al 13/09/2012.
5. European Commission - Scientific Committee on Food. *Opinion of the Scientific Committee on Food on the tolerable upper intake level of folate*. Brussel: European Commission; 2000. (SCF/CS/NUT/UPPLEV/18). Disponibile all'indirizzo: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out80e\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out80e_en.pdf); ultima consultazione 10/10/2012.
6. Istituto Superiore di Sanità – Centro Nazionale Malattie Rare. *Tabella alimenti ricchi in folati*. Roma: Istituto Superiore di Sanità. Disponibile all'indirizzo: [www.iss.it/binary/acid/cont/tabella.1154705795.pdf](http://www.iss.it/binary/acid/cont/tabella.1154705795.pdf); ultima consultazione 10/10/2012.
7. Pietrzik K, Bailey L, Shane B. Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate: comparison of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet* 2010;49(8):535-48.
8. Giorgino F. L'acido folico in ostetricia e ginecologia. 2009. Disponibile all'indirizzo: [www.cybermedica.org/ecm/db/scripts/sys/show\\_htmlpage.php?hp=home%2Fginecologo2003%2Fattualita%2F08\\_giorgino\\_acido\\_folico.html](http://www.cybermedica.org/ecm/db/scripts/sys/show_htmlpage.php?hp=home%2Fginecologo2003%2Fattualita%2F08_giorgino_acido_folico.html); ultima consultazione 13/09/2012.
9. Cacciapuoti F. Hyper-homocysteinemia: a novel risk factor or a powerful marker for cardiovascular diseases? Pathogenetic and therapeutical uncertainties. *J Thromb Thrombolysis* 2011;32(1):82-8.
10. Istituto Superiore di Sanità – Centro Nazionale Malattie Rare. *Raccomandazione per la riduzione del rischio di difetti congeniti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità. Disponibile all'indirizzo: [www.iss.it/binary/acid/cont/raccomandazione.1154944407.pdf](http://www.iss.it/binary/acid/cont/raccomandazione.1154944407.pdf); ultima consultazione 13/09/2012.
11. Protiva P, Mason JB, Liu Z, Hopkins ME, Nelson C, Marshall JR, Lambrecht RW, Pendyala S, Kopelovich L, Kim M, Kleinstein SH, Laird PW, Lipkin M, Holt PR. Altered folate availability modifies the molecular environment of the human colorectum: implications for colorectal carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011;4(4):530-43.
12. Yeung LF, Cogswell ME, Carriquiry AL, Bailey LB, Pfeiffer CM, Berry RJ. Contributions of enriched cereal-grain products, ready-to-eat cereals, and supplements to folic acid and vitamin B-12 usual intake and folate and vitamin B-12 status in US children: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 2003-2006. *Am J Clin Nutr* 2011;93(1):172-85.
13. Lim U, Wang SS, Hartge P, Cozen W, Kelemen LE, Chanock S, Davis S, Blair A, Schenk M, Rothman N, Lan Q. Gene-nutrient interactions among determinants of folate and one-carbon metabolism on the risk of non-Hodgkin lymphoma: NCI-SEER case-control study. *Blood* 2007;109(7):3050-9.

14. Król E, Krejpcio Z, Chmurzynska A. Folic acid and protein content in maternal diet and postnatal high-fat feeding affect the tissue levels of iron, zinc, and copper in the rat. *Biol Trace Elem Res* 2011;144(1-3):885-93.
15. Kulkarni A, Dangat K, Kale A, Sable P, Chavan-Gautam P, Joshi S Effects of altered maternal folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid on placental global DNA methylation patterns in Wistar rats. *PLoS One* 2011;10;6(3):e17706.
16. Roy S, Kale A, Dangat K, Sable P, Kulkarni A, Joshi S. Maternal micronutrients (folic acid and vitamin B(12)) and omega 3 fatty acids: Implications for neurodevelopmental risk in the rat offspring. *Brain Dev* 2012;34(1):64-71.
17. Picciano MF, West SG, Ruch AL, Kris-Etherton PM, Zhao G, Johnston KE, Maddox DH, Fishell VK, Dirienzo DB, Tamura T. Effect of cow milk on food folate bioavailability in young women. *Am J Clin Nutr* 2004;80(6):1565-9.
18. Ye R, Ren A, Zhang L, Li Z, Liu J, Pei L, Zheng X. Tea drinking as a risk factor for neural tube defects in northern china. *Epidemiology* 2011;22(4):491-6.
19. Hall MN, Liu X, Slavkovich V, Ilievski V, Mi Z, Alam S, Factor-Litvak P, Ahsan H, Graziano JH, Gamble MV. Influence of cobalamin on arsenic metabolism in Bangladesh. *Environ Health Perspect* 2009;117(11):1724-9.
20. Majumdar S, Maiti A, Karmakar S, Das AS, Mukherjee S, Das D, Mitra C. Antiapoptotic efficacy of folic acid and vitamin B(12) against arsenic-induced toxicity. *Environ Toxicol* 2012;27(6):351-63.
21. Gelineau-van Waes J, Voss KA, Stevens VL, Speer MC, Riley RT. Maternal fumonisin exposure as a risk factor for neural tube defects. *Adv Food Nutr Res* 2009;56:145-81.
22. McNulty H, Pentieva K. Folate bioavailability. *Proc Nutr Soc* 2004;63:529-36.
23. Gregory JF, 3rd. Bioavailability of folate. *Eur J Clin Nutr* 1997;51 Suppl 1: S54-9.
24. Pfeiffer CM, Rogers LM, Bailey LB, Gregory JF, 3rd. Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. *Am J Clin Nutr* 1997; 66(6):1388-97.
25. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline and Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. National Academy Press (Ed.). Washington DC; 1998. p. 196-305.
26. German Nutrition Society, Austrian Nutrition Society, Swiss Society for Nutrition Research, Swiss Nutrition Association: *Reference Values for Nutrient Intake (D-A-CH)*. Frankfurt am Main, Umschau/Braus, 2000.
27. Nordic Nutrition Recommendations. Folate. In: Nordic Council of Ministers (Ed.). *Integrating nutrition and physical activity*. 4th edition., Copenhagen; 2004. p. 287-96.
28. World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations. *Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Second edition*. Geneve, Roma: WHO, FAO; 2004. Disponibile all'indirizzo: [www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241546123/en/index.html](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241546123/en/index.html); ultima consultazione 10/10/2012.
29. Brouwer IA, van Dusseldorp M, West CE, et al. Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J Nutr* 1999;129:1135-9.
30. Ruggeri S, Vahteristo LT, Aguzzi A, Finglas P, Carnovale E. Determination of folate vitamers in food and in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1999;855(1):237-45.

31. Winkels RM, Brouwer IA, Siebelink E, Katan MB, Verhoef P. Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid. *Am J Clin Nutr* 2007; 85(2):465-73.
32. Vujkovic M, Steegers EA, Looman CW, Ocké MC, van der Spek PJ, Steegers-Theunissen RP. The maternal Mediterranean dietary pattern is associated with a reduced risk of spina bifida in the offspring. *BJOG* 2009;116(3):408-15.
33. Obermann-Borst S, Vujkovic M, de Vries J, Wildhagen M, Looman C, de Jonge R, Steegers E, Steegers-Theunissen R. A maternal dietary pattern characterised by fish and seafood in association with the risk of congenital heart defects in the offspring. *BJOG* 2011;118(10):1205-15.
34. Ahrens K, Yazdy MM, Mitchell AA, Werler MM. Folic Acid Intake and Spina Bifida in the Era of Dietary Folic Acid Fortification. *Epidemiology* 2011;22(5):731-7.
35. Chmurzynska A, Stachowiak M, Gawecki J, Pruszyńska-Oszmalek E, Tubacka M. Protein and folic acid content in the maternal diet determine lipid metabolism and response to high-fat feeding in rat progeny in an age-dependent manner. *Genes Nutr* 2012;7(2):223-34.
36. Lee JE, Willett WC, Fuchs CS, Smith-Warner SA, Wu K, Ma J, Giovannucci E. Folate intake and risk of colorectal cancer and adenoma: modification by time. *Am J Clin Nutr* 2011;93(4):817-25.
37. Sanchez GV, Weinstein SJ, Stolzenberg-Solomon RZ. Is dietary fat, vitamin D, or folate associated with pancreatic cancer? *Mol Carcinog* 2012;51(1):119-27.
38. Pizzolo F, Blom HJ, Choi SW, Girelli D, Guarini P, Martinelli N, Stanzial AM, Corrocher R, Olivieri O, Friso S. Folic Acid effects on s-adenosylmethionine, s-adenosylhomocysteine, and DNA methylation in patients with intermediate hyperhomocysteinemia. *J Am Coll Nutr* 2011;30(1):11-8.
39. Bailey RL, Mills JL, Yetley EA, Gahche JJ, Pfeiffer CM, Dwyer JT, Dodd KW, Sempos CT, Betz JM, Picciano MF. Unmetabolized serum folic acid and its relation to folic acid intake from diet and supplements in a nationally representative sample of adults aged > or =60 y in the United States. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(2):383-9.
40. Boilson A, Staines A, Kelleher CC, Daly L, Shirley I, Shrivastava A, Bailey SW, Alverson PB, Ayling JE, McDermott AP, Maccosy A, Scott JM, Sweeney MR. Unmetabolized folic acid prevalence is widespread in the older Irish population despite the lack of a mandatory fortification program. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(3):613-21.
41. Ebbing M, Bønaa KH, Nygård O, Arnesen E, Ueland PM, Nordrehaug JE, Rasmussen K, Njølstad I, Refsum H, Nilsen DW, Tverdal A, Meyer K, Vollset SE. Cancer incidence and mortality after treatment with folic acid and vitamin B12. *JAMA* 2009;302(19):2119-26.
42. Levine AJ, Figueiredo JC, Lee W, Conti DV, Kennedy K, Duggan DJ, Poynter JN, Campbell PT, Newcomb P, Martinez ME, Hopper JL, Le Marchand L, Baron JA, Limburg PJ, Ulrich CM, Haile RW. A candidate gene study of folate-associated one carbon metabolism genes and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19(7):1812-21.
43. Goldman ID, Chattopadhyay S, Zhao R, Moran R. The antifolates: evolution, new agents in the clinic, and how targeting delivery via specific membrane transporters is driving the development of a next generation of folate analogs *Curr Opin Investig Drugs* 2010;11(12):1409-23.
44. Troen AM, Mitchell B, Sorensen B, Wener MH, Johnston A, Wood B, Selhub J, McTiernan A, Yasui Y, Oral E, Potter JD, Ulrich CM. Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women. *Natural Killer J Nutr* 2006;136(1):189-94.
45. Protiva P, Mason JB, Liu Z, Hopkins ME, Nelson C, Marshall JR, Lambrecht RW, Pendyala S, Kopelovich L, Kim M, Kleinstein SH, Laird PW, Lipkin M, Holt PR. Altered folate availability modifies the molecular environment of the human colorectum: implications for colorectal carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011;4(4):530-43.

46. Obeid R, Kasoha M, Kirsch SH, Munz W, Herrmann W. Concentrations of unmetabolized folic acid and primary folate forms in pregnant women at delivery and in umbilical cord blood. *Am J Clin Nutr* 2010;92(6):1416-22.
47. Houghton LA, Yang J, O'Connor DL. Unmetabolized folic acid and total folate concentrations in breast milk are unaffected by low-dose folate supplements. *Am J Clin Nutr* 2009;89(1):216-20.
48. Ly A, Lee H, Chen J, Sie KK, Renlund R, Medline A, Sohn KJ, Croxford R, Thompson LU, Kim YI. Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on mammary tumor risk in the offspring. *Cancer Res* 2011;71(3):988-97.
49. Bailey SW, Ayling JE. The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(36):15424-9.
50. Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Folate intake and risk of breast cancer by estrogen and progesterone receptor status in a Swedish cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(12):3444-9.
51. Harris HR, Bergkvist L, Wolk A. Folate intake and breast cancer mortality in a cohort of Swedish women. *Breast Cancer Res Treat* 2012;132(1):243-50.
52. Roswall N, Olsen A, Christensen J, Dragsted LO, Overvad K, Tjønneland A. Micronutrient intake and breast cancer characteristics among postmenopausal women. *Eur J Cancer Prev* 2010;19(5):360-5.
53. Ericson U, Borgquist S, Ivarsson MI, Sonestedt E, Gullberg B, Carlson J, Olsson H, Jirstrom K, Wirfalt E. Plasma folate concentrations are positively associated with risk of estrogen receptor beta negative breast cancer in a Swedish nested case control study. *J Nutr* 2010;140(9):1661-8.
54. Kalmbach RD, Choumenkovitch SF, Troen AP, Jacques PF, D'Agostino R, Selhub J. A 19-Base Pair Deletion Polymorphism in Dihydrofolate Reductase Is Associated with Increased Unmetabolized Folic Acid in Plasma and Decreased Red Blood Cell Folate. *J Nutr* 2008;138(12):2323-7.
55. Leclercq C, Arcella D, Piccinelli R, Sette S, Le Donne C, Turrini A; INRAN-SCAI 2005-06 Study Group. The Italian National Food Consumption Survey INRAN-SCAI 2005-06: main results in terms of food consumption. *Public Health Nutr* 2009;12(12):2504-32.
56. Sofi F, Vecchio S, Giuliani G, Martinelli F, Marcucci R, Gori AM, Fedi S, Casini A, Surrenti C, Abbate R, Gensini GF. Dietary habits, lifestyle and cardiovascular risk factors in a clinically healthy Italian population: the 'Florence' diet is not Mediterranean. *Eur J Clin Nutr* 2005;59(4):584-91.
57. Polito A, Intorre F, Andriollo-Sanchez M, Azzini E, Raguzzini A, Meunier N, Ducros V, O'Connor JM, Coudray C, Roussel AM, Maiani G. Estimation of intake and status of vitamin A, vitamin E and folate in older European adults: the ZENITH. *Eur J Clin Nutr* 2005;59 Suppl 2:S42-7.
58. Gori AM, Sofi F, Corsi AM, Gazzini A, Sestini I, Lauretani F, Bandinelli S, Gensini GF, Ferrucci L, Abbate R. Predictors of vitamin B6 and folate concentrations in older persons: the InCHIANTI study. *Clin Chem* 2006;52(7):1318-24.
59. Agodi A, Barchitta M, Valenti G, Marzagalli R, Frontini V, Marchese AE. Increase in the prevalence of the MTHFR 677 TT polymorphism in women born since 1959: potential implications for folate requirements. *Eur J Clin Nutr* 2011;65(12):1302-8.
60. Istituto Nazionale di Statistica. *Tabella Struttura per età della popolazione al 1° gennaio - Anni 2008-2011*. Roma: ISTAT; 2012. Disponibile all'indirizzo: [demo.istat.it/altridati/indicatori/2010/Tab\\_6.pdf](http://demo.istat.it/altridati/indicatori/2010/Tab_6.pdf); ultima consultazione 13/09/2012.
61. Olivieri A. *Il sale iodato*. Roma: Istituto Superiore di Sanità. Disponibile all'indirizzo: <http://www.iss.it/osnami/citt/cont.php?id=40&lang=1&tipo=13>; ultima consultazione al 13/09/2012.
62. Fleischman AR, Oinuma M. Fortification of corn masa flour with folic acid in the United States. *Am J Public Health* 2011;101(8):1360-4.
63. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Scientific Opinion on the safety and efficacy of folic acid as a feed additive for all animal species. *EFSA Journal* 2012;10(5):2674.

64. Sheehy T, Sharma S. Use of FAO food balance sheets to estimate the potential ability of novel folate-enriched eggs to increase the folate supply in European Union countries. *Public Health Nutr* 2010; 31:1-6.
65. LeBlanc JG, Laiño JE, del Valle MJ, Vannini V, van Sinderen D, Taranto MP, de Valdez GF, de Giori GS, Sesma F. B-group vitamin production by lactic acid bacteria--current knowledge and potential applications. *J Appl Microbiol* 2011;111(6):1297-309.
66. Holasová M, Fiedlerová V, Roubal P, Pechačová M. Biosynthesis of folates by lactic acid bacteria and propionibacteria in fermented milk. *Czech J Food Sci* 2004;22:175-81.
67. Rossi M, Amaretti A, Raimondi S. Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* 2011;3(1):118-34.
68. Strozzi GP, Mogna L. Quantification of folic acid in human feces after administration of Bifidobacterium probiotic strains. *J Clin Gastroenterol* 2008;42 Suppl 3 Pt 2:S179-84.
69. Shohag MJ, Wei YY, Yu N, Zhang J, Wang K, Patring J, He ZL, Yang XE. Natural variation of folate content and composition in spinach (*Spinacia oleracea*) germplasm. *J Agric Food Chem* 2011;59(23):12520-6.
70. Hanson AD, Gregory JF 3rd. Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2011;62:105-25.
71. Bassett MN, Sammán NC. Folate content and retention in selected raw and processed foods. *Arch Latinoam Nutr* 2010;60(3):298-305.
72. McKillop DJ, Pentieva K, Daly D, McPartlin JM, Hughes J, Strain JJ, Scott JM & McNulty H. The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *Br J. Nutr* 2002;88:681-8.
73. Han YH, Yon M, Hyun TH. Folate intake estimated with an updated database and its association to blood folate and homocysteine in Korean college students. *Eur J Clin Nutr* 2005;59(2):246-54.