

## Artigo original

# Redução dos níveis séricos de ácido fólico em pacientes com a doença de Alzheimer

Serum folic acid is reduced in patients with Alzheimer's disease

CESAR C. ALMEIDA<sup>1</sup>, HELENA P. BRENTANI<sup>2</sup>, ORESTES V. FORLENZA<sup>1</sup>, BRENO S. DINIZ<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Neurociências "Alzira Denise Hertzog Silva" (LIM-27) – Departamento e Instituto de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP.

<sup>2</sup> Laboratório de Genética Psiquiátrica, Departamento e Instituto de Psiquiatria da FMUSP, São Paulo, SP.

<sup>3</sup> Western Psychiatric Institute and Clinic and Department of Psychiatry, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA.

Recebido: 23/1/2012 – Aceito: 19/2/2012

## Resumo

**Contexto:** Deficiência de vitaminas do complexo B tem sido associada a deterioração cognitiva e quadros demenciais em idosos. **Objetivo:** Neste trabalho, foi avaliado se pacientes com doença de Alzheimer (DA) e com comprometimento cognitivo leve (CCL) apresentam níveis séricos de ácido fólico e cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) menores que idosos controles. **Métodos:** Foram recrutados 146 idosos (40 com DA, 56 com CCL e 49 idosos controles) para este estudo. Os níveis séricos de ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> foram avaliados pelo método de eletroquimioluminescência. **Resultados:** Os pacientes com DA apresentaram redução estatisticamente significativa nos níveis de ácido fólico em relação aos idosos com CCL e controles ( $p = 0,02$ ). Esses resultados mantiveram-se estatisticamente significativos após controlar por variáveis sociodemográficas e desempenho cognitivo. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos níveis de vitamina B<sub>12</sub> nem em variáveis hematológicas entre os grupos. **Conclusão:** Esses resultados reforçam a importância de anormalidades em aspectos nutricionais, em particular do metabolismo de um-carbono, na fisiopatologia da DA.

Almeida CC, et al. / Rev Psiq Clín. 2012;39(3):90-3

**Palavras-chave:** Ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub>, fatores nutricionais, metabolismo de um-carbono.

## Abstract

**Background:** Complex B vitamin deficiency has been associated to cognitive impairment and dementing disorders in the elderly. **Objective:** This work aims to assess whether patients with Alzheimer's disease (AD) and mild cognitive impairment (MCI) have lower levels of folic acid and cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) compared to age and gender-matched controls. **Methods:** One hundred and forty six elderly subjects (40 AD, 56 MCI and 49 healthy older adults) were recruited for this study. Serum folic acid and vitamin B<sub>12</sub> levels were measured by electrochemoluminescence. **Results:** Compared to MCI and healthy controls a statistically significant reduction in serum concentrations of folic acid in AD patients was found ( $p = 0.02$ ). This result remained statistically significant after controlling for socio-demographic and cognitive performance variables ( $p = 0.01$ ). No significant differences were found in serum concentrations of vitamin B<sub>12</sub> in patients with AD, MCI and healthy controls. No significant changes in hematologic parameters were observed across these diagnostic groups. **Discussion:** The present study provides additional evidence that folic acid is reduced in patients with AD and reinforces the importance of nutritional changes, in particular the one-carbon metabolism, in the physiopathology of AD.

Almeida CC, et al. / Rev Psiq Clín. 2012;39(3):90-3

**Keywords:** Folic acid, vitamin B<sub>12</sub>, Alzheimer's disease, nutritional factors, one-carbon metabolism.

## Introdução

Nos últimos anos, alterações da cascata da homocisteína e vias metabólicas relacionadas têm sido relacionadas à fisiopatologia e, possivelmente, à prevenção da doença de Alzheimer (DA)<sup>1-3</sup>. A homocisteína é um aminoácido com radical sulfúrico derivado do metabolismo da metionina principalmente por duas vias metabólicas: remetilização e transulfuração<sup>4</sup>. Essas vias são reguladas pela ingestão dietética de metionina, mas também por outros fatores nutricionais, em particular, os níveis de folato e vitamina B<sub>12</sub>. O último mecanismo estimula a via de remetilização levando à conversão da homocisteína em metionina<sup>5</sup>. Altos níveis de homocisteína estão associados a maior estresse oxidativo, metilação do DNA e apoptose, sendo um fator de risco para várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares e neurodegenerativas<sup>6-8</sup>.

Ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> níveis podem servir como um marcador substituto (*surrogate marker*) dos níveis de homocisteína em humanos. Menores níveis séricos de ambos os fatores se correlacionam significativamente com níveis mais elevados de homocisteína em diversos estudos<sup>9-12</sup>. Dessa maneira, a suplementação dietética

de ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> poderia reduzir os níveis de homocisteína<sup>13</sup> e, secundariamente, melhorar o desempenho cognitivo e reduzir o risco de DA idosos<sup>14</sup>. Estudos com modelos animais de DA sugerem que a suplementação de ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> reduziu as lesões neuropatológicas relacionadas à DA com significativa melhora cognitiva nesses modelos<sup>15,16</sup>. A associação entre a ingestão de ácido fólico elevado e a redução do risco de DA também tem sido relatada<sup>17</sup>, apesar de essas evidências, estudos observacionais e ensaios clínicos randomizados não demonstrarem benefício significativo da suplementação de ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> em reduzir a progressão da doença ou melhorar o desempenho cognitivo dos pacientes com DA<sup>18-20</sup>.

Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar diferenças dos níveis séricos de ácido fólico e cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) em pacientes com DA e comprometimento cognitivo leve (CCL), em comparação com idosos controles saudáveis pareados por idade, e avaliar a relação entre esses níveis séricos dessas vitaminas e o desempenho cognitivo nesses sujeitos.

## Métodos

Cento e quarenta e seis idosos foram recrutados para este estudo. Eles fazem parte de uma coorte clínica dedicada ao estudo de envelhecimento cognitivo. Descrição detalhada da avaliação clínica e cognitiva e dos procedimentos de diagnóstico pode ser encontrada em outros trabalhos<sup>21,22</sup>. Em resumo, os pacientes foram submetidos a uma avaliação cognitiva abrangente que incluía a administração do Teste de Memória Rivermead Comportamental (RBMT), da Avaliação de Memória *Fuld Object* (FOME), do *Trail Making Test A e B*, da fluência verbal semântica (categoria: frutas) e do teste cognitivo de curta duração (SKT). A pontuação no Miniexame do Estado Mental (MEEM) foi usada como uma medida de desempenho cognitivo global.

O diagnóstico da DA foi feito de acordo com os critérios de diagnóstico NINCDS-ADRDA<sup>23</sup>. O diagnóstico de CCL foi feito de acordo com os critérios da Clínica Mayo<sup>24</sup>. Idosos sem evidência de comprometimento cognitivo foram considerados como controles saudáveis.

Após avaliação clínica e cognitiva, amostras de sangue foram retiradas todas as disciplinas no período da manhã após 10 horas de jejum. Ácido fólico no soro e vitamina B<sub>12</sub> níveis foram medidos por eletroquimioluminescência, como parte da rotina de avaliação laboratorial.

## Análise estatística

Testes Kolmogorov-Smirnov foram realizados para avaliar o padrão de distribuição das variáveis contínuas. Como as variáveis de interesse neste estudo (ou seja, ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub>) não apresentaram distribuição normal ( $p < 0,001$ ), realizaram-se testes não paramétricos estatísticos (Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney, quando

aplicável) para avaliar as diferenças entre os grupos diagnósticos. Testes de qui-quadrado foram realizados para avaliar as diferenças na distribuição de frequência das variáveis dicotômicas. Testes de correlação de Spearman foram feitos para avaliar a correlação entre ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> níveis e as variáveis clínicas e cognitivas.

## Resultados

Tabelas 1 e 2 mostram as variáveis sociodemográficas e de desempenho cognitivo em pacientes e controles. Como esperado, os pacientes com DA e CCL eram mais velhos, menos escolarizados e tiveram pior desempenho cognitivo. Não houve diferenças significativas no estado nutricional geral, como verificado por proteína total e níveis de hemoglobina, entre os grupos diagnósticos (Tabela 3).

Pacientes com DA mostraram uma redução significativa nas concentrações séricas de ácido fólico em comparação com indivíduos CCL e controles saudáveis. Não foram observadas diferenças significativas entre CCL e controles saudáveis. Além disso, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações séricas de vitamina B<sub>12</sub> entre os grupos diagnósticos (Tabela 3).

Como idade e educação foram significativamente diferentes entre os grupos, foi realizada uma análise de covariância para controlar os efeitos potenciais de confusão dessas variáveis sobre os níveis de ácido fólico. Depois de controlar esses fatores, os níveis de ácido fólico permaneceram significativamente reduzidos nos pacientes com DA ( $F = 4,5$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,01$ ).

Análise de Spearman mostrou uma correlação significativa entre os níveis de ácido fólico e dezenas de memória (escores de triagem RBMT,  $\rho = 0,190$ ,  $p = 0,03$ ), fluência verbal ( $\rho = 0,247$ ,  $p = 0,006$ ) e Trail A  $\rho = -0,196$ ,  $p = 0,03$ ). Não houve correlação significativa com a idade, níveis educacionais, hemoglobina ou níveis de proteína sérica total ou pontuação em outros testes cognitivos.

**Tabela 1.** Dados sociodemográficos de acordo com os grupos diagnósticos

	Diagnóstico			p
	Controles (n = 49)	CCL (n = 56)	DA (n = 40)	
	Mediana [P25-P75]	Mediana [P25-P75]	Mediana [P25-P75]	
Gênero (M/H)	40/9	45/11	28/12	0,36
Idade	67 [64-70]	70 [67-75]	75 [71-77]	< 0,001
Escolaridade	15 [8-18]	8 [4-13]	4 [4-11]	< 0,001

M: mulheres; H: homens; CCL: comprometimento cognitivo leve; DA: doença de Alzheimer; P25: percentil 25; P75: percentil 75.

**Tabela 2.** Pontuação em testes cognitivos de acordo com os grupos diagnósticos

	Diagnóstico			p
	Controles (n = 49)	CCL (n = 56)	DA (n = 40)	
	Mediana [P25-P75]	Mediana [P25-P75]	Mediana [P25-P75]	
MEEM	29 [27-30]	27 [26-29]	18 [14-22]	< 0,001
RBMT ( <i>screening</i> )	11 [9-12]	8 [6-9]	2 [0-4]	< 0,001
RBMT (perfil)	22 [21-24]	18 [16-20]	6 [1-11]	< 0,001
FOME (total)	45 [44-47]	40 [37-44]	18 [12-31]	< 0,001
FOME (recordação tardia)	10 [9-10]	9 [8-10]	3 [2-6]	< 0,001
Fluência verbal (frutas)	15 [13-17]	12 [10-14]	8 [7-11]	< 0,001
Trilhas A (s)	49 [40-55]	65 [54-86]	101 [66-160]	< 0,001
Trilhas B (s)	97 [78-133]	188 [141-219]	240 [207-268]	< 0,001
SKT	2 [1-3]	3 [2-5]	11 [8-16]	< 0,001

MEEM: Miniexame do Estado Mental; RBMT: *Rivermead Behavioral Memory Test*; FOME: *Fuld Object Memory Evaluation*; SKT: *Short Cognitive Test*; P25: percentil 25; P75: percentil 75.

**Tabela 3.** Ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub>, hemoglobina e níveis de proteína total de acordo com grupos de diagnóstico

	Diagnóstico			p
	Controles (n = 49)	CCL (n = 56)	DA (n = 40)	
	Mediana [P25-P75]	Mediana [P25-P75]	Mediana [P25-P75]	
Ácido fólico (ng/ml)	9,20 [5,60-13,90]	9,40 [6,50-14,15]	6,20 [4,05-11,80]	0,02
Vitamina B <sub>12</sub> (pg/ml)	368,00 [251,00-488,00]	402,50 [300,50-735,50]	354,50 [214,00-451,00]	0,09
Hemoglobina (g/dl)	14,00 [13,10-14,60]	14,00 [13,35-14,60]	13,80 [13,05-15,00]	0,9
Proteínas total (g/dl)	7,2 [7,1-7,5]	7,2 [7,0-7,4]	7,4 [7,5-7,7]	0,4

P25: percentil 25; P75: percentil 75.

## Discussão

Em nosso estudo, encontrou-se uma redução significativa dos níveis de ácido fólico em pacientes com DA em comparação com indivíduos com MCI e idosos saudáveis, independentemente da idade, nível educacional e estado nutricional geral. Não foram observadas diferenças entre os controles idosos e MCI. Além disso, níveis mais baixos de ácido fólico se correlacionaram a pior desempenho cognitivo, em particular em memória, memória e velocidade psicomotora. É importante ressaltar que, apesar de diminuir os níveis de ácido fólico em pacientes com DA, os valores medianos estavam acima do menor intervalo de valores de referência laboratorial (i.e. 4,2-19,9 ng/ml). Assim, esses pacientes não apresentaram deficiência de vitamina clinicamente significativa que pudesse explicar os resultados presentes. Assim, nossos resultados sugerem que a redução dos níveis de ácido fólico é uma alteração metabólica relacionada à fisiopatologia da DA e com efeito negativo sobre o desempenho cognitivo desses pacientes. Pelo fato de os pacientes com CCL não apresentarem redução semelhante nas concentrações de ácido fólico, pode-se especular que essa alteração seja observada apenas em fases mais avançadas do processo neurodegenerativo (i.e. quando os indivíduos já apresentam quadro demencial clinicamente manifesto). No entanto, deve-se levar em conta que a falta de diferença entre pacientes com CCL e controles normais pode ser secundária à heterogeneidade do grupo CCL.

Nossos resultados estão de acordo com relatos prévios na literatura<sup>25,26</sup>. Esses estudos encontraram que, quanto menores os níveis de ácido fólico, maior o risco de DA. Em contraste, esses estudos também encontraram uma associação significativa entre redução de vitamina B<sub>12</sub> níveis e DA. Diferenças metodológicas, como o tamanho da amostra e o uso de diferentes critérios diagnósticos, podem explicar em parte esses resultados diferentes.

Os mecanismos pelos quais a redução de ácido fólico se relaciona com as alterações fisiopatológicas na DA ainda necessitam ser elucidados. Uma possível explicação é a evidência de que existe uma relação inversa entre ácido fólico e os níveis de homocisteína<sup>19</sup>. O folato é cofator no metabolismo de um-carbono, durante o qual promove a regeneração da metionina a partir de homocisteína, que é um aminoácido sulfurado altamente reativo. Assim, pacientes com baixos níveis de ácido fólico podem apresentar níveis de homocisteína elevados, o que, por sua vez, é neurotóxico e pode levar a alterações degenerativas<sup>27</sup>. Isso é reforçado pela evidência de que níveis elevados de homocisteína estão independentemente associados ao risco da DA<sup>28,29</sup>. Portanto, níveis reduzidos de folato e aumentados de homocisteína, além do papel bem estabelecido na indução de danos no DNA, podem aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio e contribuir para excitotoxicidade, disfunção mitocondrial e apoptose. Além disso, baixos níveis de folato determinam um desequilíbrio entre a quinase glicogênio sintase 3-beta (GSK-3b) e a proteína fosfatase 2A atividade (PP2A), levando à hiperfosforilação anormal da tau<sup>30</sup>. Finalmente, a metionina pode ser convertida em S-adenosilmetionina (SAM), o doador de metila principal em reações de metilação. Níveis reduzidos de folato levam a níveis mais baixos de SAM, que, por sua vez, aumenta a metilação do DNA, levando a alterações no controle epigenético da aprendizagem e aquisição da

memória<sup>31</sup>. Portanto, a redução do folato, como observado em nosso estudo, pode ocasionar vários efeitos negativos para o funcionamento neuronal, que estão relacionados à fisiopatologia da AD<sup>32</sup>.

Em conclusão, nosso estudo mostrou uma redução significativa nos níveis de folato em pacientes com DA em comparação com controles saudáveis. Nossos resultados destacam a importância da avaliação dos aspectos nutricionais no DA e também para um possível papel da deficiência de folato em seus aspectos fisiopatológicos. Apesar de ensaios clínicos anteriores não encontrarem um efeito significativo da suplementação de ácido fólico para melhorar a cognição em pacientes com DA, não se podem descartar possíveis efeitos benéficos de longo prazo com a suplementação de ácido fólico para reduzir o risco de DA.

## Agradecimentos

Nenhum a declarar.

## Conflito de interesses

Nenhum a declarar.

## Financiamento

Este trabalho foi parcialmente financiado por verbas da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (Fapesp 09/52825-8 n° Grant, Brasil) e Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog da Silva (ABADHS).

## Papel de fonte de financiamento

As fontes de financiamento não têm qualquer papel na concepção do estudo, concepção, análise de dados e elaboração do manuscrito.

## Contribuições dos autores

Cesar C. Almeida desenhou o estudo e os dados coletados, realizou a análise estatística e escreveu o manuscrito. Helena P. Brentani e Orestes Forlenza V. analisaram os dados e escreveram o manuscrito.

## Referências

1. Donini LM, De Felice MR, Cannella C. Nutritional status determinants and cognition in the elderly. Arch Gerontol Geriatr. 2007;44(Suppl 1):143-53.
2. Daviglus ML, Plassman BL, Pirzada A, Bell CC, Bowen PE, Burke JR, et al. Risk Factors and Preventive Interventions for Alzheimer Disease: State of the Science. Arch Neurol. 2011;68:1185-90.
3. Zhuo JM, Praticò D. Acceleration of brain amyloidosis in an Alzheimer's disease mouse model by a folate, vitamin B6 and B12-deficient diet. Exp Gerontol. 2010;45:195-201.
4. Selhub J. Homocysteine metabolism. Annu Rev Nutr. 1999;19:217-46.
5. Fuso A, Seminara L, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Scarpa S. S-adenosyl-methionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation

- status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol Cell Neurosci*. 2005;28:195-204.
6. Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1182-4.
  7. Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, et al. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002;22:1752-62.
  8. Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett*. 2006;580:2994-3005.
  9. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1998;55:1449-55.
  10. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*. 2003;26:137-46.
  11. Quadri P, Fragiaco C, Pezzati R, Zanda E, Forloni G, Tettamanti M, et al. Homocysteine, folate, and vitamin B-12 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and vascular dementia. *Am J Clin Nutr*. 2004;80:114-22.
  12. Remacha AF, Souto JC, Piñana JL, Sardà MP, Queraltó JM, Martí-Fabregas J, et al. Vitamin B12 deficiency, hyperhomocysteinemia and thrombosis: a case and control study. *Int J Hematol*. 2011;93:458-64.
  13. Albert CM, Cook NR, Gaziano JM, Zaharris E, MacFadyen J, Danielson E, et al. Effect of folic acid and B vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk for cardiovascular disease: a randomized trial. *JAMA*. 2008;299:2027-36.
  14. Das UN. Folic acid and polyunsaturated fatty acids improve cognitive function and prevent depression, dementia, and Alzheimer's disease – but how and why? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2008;78:11-9.
  15. Chan A, Shea TB. Folate deprivation increases presenilin expression, gamma-secretase activity, and Abeta levels in murine brain: potentiation by ApoE deficiency and alleviation by dietary S-adenosyl methionine. *J Neurochem*. 2007;102:753-60.
  16. Parachikova A, Green KN, Hendrix C, LaFerla FM. Formulation of a medical food cocktail for Alzheimer's disease: beneficial effects on cognition and neuropathology in a mouse model of the disease. *PLoS One*. 2010;5:e14015.
  17. Luchsinger JA, Tang MX, Miller J, Green R, Mayeux R. Relation of higher folate intake to lower risk of Alzheimer disease in the elderly. *Arch Neurol*. 2007;64:86-92.
  18. Aisen PS, Schneider LS, Sano M, Diaz-Arrastia R, Van Dyck CH, Weiner ME, et al. Alzheimer Disease Cooperative Study. High-dose B vitamin supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2008;300:1774-83.
  19. Morris MC, Evans DA, Schneider JA, Tangney CC, Bienias JL, Aggarwal NT. Dietary folate and vitamins B-12 and B-6 not associated with incident Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2006;9:435-43.
  20. Nelson C, Wengreen HJ, Munger RG, Corcoran CD. Dietary folate, vitamin B-12, vitamin B-6 and incident Alzheimer's disease: the cache county memory, health and aging study. *J Nutr Health Aging*. 2009;13:899-905.
  21. Diniz BS, Nunes PV, Yassuda MS, Pereira FS, Flaks MK, Viola LF, et al. Mild cognitive impairment: cognitive screening or neuropsychological assessment? *Rev Bras Psiquiatr*. 2008;30:316-21.
  22. Forlenza OV, Diniz BS, Talib LL, Radanovic M, Yassuda MS, Ojopi EB, et al. Clinical and biological predictors of Alzheimer's disease in patients with amnesic mild cognitive impairment. *Rev Bras Psiquiatr*. 2010;32:216-22.
  23. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984;34:939-44.
  24. Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, et al. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2001;58:1985-92.
  25. Wang HX, Wahlin A, Basun H, Fastbom J, Winblad B, Fratiglioni L. Vitamin B(12) and folate in relation to the development of Alzheimer's disease. *Neurology*. 2001;56:1188-94.
  26. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Martelli M, Servadei L, Brunetti N, et al. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*. 2005;82:636-43.
  27. Herrmann W, Obeid R. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49:435-41.
  28. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2002;346:476-83.
  29. Ho RC, Cheung MW, Fu E, Win HH, Zaw MH, Ng A, et al. Is high homocysteine level a risk factor for cognitive decline in elderly? A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2011;19:607-17.
  30. Nocolia V, Fusco A, Cavallaro RA, Di Luzio A, Scarpa S. B vitamin deficiency promotes tau phosphorylation through regulation of GSK3beta and PP2A. *J Alzheimers Dis*. 2010;19:895-907.
  31. Yu NK, Baek SH, Kaang BK. DNA methylation-mediated control of learning and memory. *Mol Brain*. 2011;4:5.
  32. Coppède F. One-carbon metabolism and Alzheimer's disease: focus on epigenetics. *Curr Genomics*. 2010;11:246-60.