

Iperomocisteinemia in età evolutiva e aspetti nutrizionali dei folati: un fattore di rischio cardiovascolare precoce

Hyperhomocysteinemia in developing age and nutritional aspects of folates: an early cardiovascular risk factor

Giuseppe Caramia, Romualdo Belardinelli¹

ABSTRACT: *Hyperhomocysteinemia in developing age and nutritional aspects of folates: an early cardiovascular risk factor. G. Caramia, R. Belardinelli.*

During the last decade, scientific evidence is mounting that elevated plasma levels of homocysteine are associated with an increased risk of atherosclerosis and cardiovascular ischemic events. Despite this evidence, however, there are still concerns about the mechanisms(s) by which homocysteine exerts its pro-atherogenic effect, and it is unclear whether the decreased plasma levels of homocysteine through diet or drugs may be paralleled by a reduction in cardiovascular risk. Experimental studies have shown that many possible mechanisms are implicated in the pro-atherogenic effect of homocysteine. Endothelial function is altered in subjects with hyperhomocysteinemia, and endothelial

dysfunction is correlated with plasma levels of homocysteine. Exercise training reduces plasma levels of homocysteine and improves endothelial function, however without evidence of a better outcome.

Larger studies are needed in order to demonstrate that the reduction of plasma levels of homocysteine by oral supplementation with folates and vitamins B6 and B12 translates into a decreased incidence of ischemic events, in particular in patients with documented coronary artery disease and ischemic encephalopathy.

Keywords: *hyperhomocysteinemia, arteriosclerotic vascular disease, cardiovascular risk factors, folic acid, 5-methyltetrahydrofolate.*

Monaldi Arch Chest Dis 2006; 66: 275-285.

Azienda Ospedaliera Materno-Infantile "G. Salesi", Ancona.

¹ Cardiologia Riabilitativa, Presidio Cardiologico "GM Lancisi", Ancona.

Corresponding author: Dr Romualdo Belardinelli, Cardiologia Riabilitativa, Presidio Cardiologico "GM Lancisi", Ancona, Italy; E-mail address: r.belardinelli@ao-umbertoprime.marche.it

Introduzione

Alcune malattie dell'età evolutiva sono causate da mutazioni di geni che codificano proteine specifiche con conseguente alterazione della struttura e/o della quantità di proteina sintetizzata. Ne derivano degli *errori congeniti del metabolismo* in quanto, la capacità funzionale della proteina, sia essa un elemento strutturale o un enzima, o un recettore, o un veicolo di trasporto, o una pompa di membrana, può essere più o meno compromessa.

Molte mutazioni genetiche sono prive di conseguenze e determinano solo quel polimorfismo che differenzia gli individui. Altre volte gli errori congeniti del metabolismo che ne derivano danno luogo ad una sintomatologia o ad uno stato di malattia variabile, da molto lieve a letale, nella prima infanzia o nell'età evolutiva o più tardi ancora nel giovane adulto e nell'anziano.

Una tale situazione si può verificare anche nel ciclo metabolico dell'aminoacido essenziale metionina. Questa, introdotta con alcuni alimenti quali carne, latte, uova, ma anche fagioli e legumi, per la perdita di un gruppo metilico dà luogo alla formazione di circa 26 mmoli di omocisteina attraverso l'attivazione della metionina ad adenosilmetionina

(SAME), donatore universale del gruppo metilico, che ceduto il metile produce adenosilomocisteina la quale per idrolisi libera omocisteina e adenosina.

L'omocisteina può essere a sua volta trasformata di nuovo in metionina attraverso un processo di rimetilazione. Questa reazione risparmiatrice di metionina è catalizzata dall'enzima metionina sintetasi (MS) che richiede il 5 metil-tetraidrofolato (MTHF) come substrato e la metilcobalamina come cofattore per trasferire il gruppo metilico del MTHF all'omocisteina: si formano così metionina e tetraidrofolato (THF). Il ciclo tende a conservare metionina che, nella forma attivata (SAME), è il maggior donatore di metili per DNA, RNA, etc. [1, 2].

A livello epatico, dove il metabolismo della metionina è particolarmente attivo, oltre all'enzima folato-dipendente è presente un altro enzima che produce per metilazione metionina da omocisteina: è una metiltransferasi che utilizza come donatore di metili la betaina o trimetilglicina.

Se la metionina è introdotta in eccesso viene inibita la metionina sintetasi, per ridurre la sintesi di metionina, e si attiva, con una serie di reazioni di transulfurazione irreversibile ad opera di due enzimi vitamina B6 dipendenti, la Cistationina-β-sintasi e la β-Cistationasi, per formare cistationina e cisteina

(fig. 1). L'omocisteina presente nel sangue e nelle urine può essere libera, sotto forma di dimero o legata alle proteine. Si intende per omocisteinemia il valore totale nel plasma delle varie forme di omocisteina. Nel sangue il valore normale è di 5-12 $\mu\text{mol/L}$. Per valori compresi fra i 12-30 $\mu\text{mol/L}$ si parla di lieve iperomocisteinemia, per valori fra 30-100 $\mu\text{mol/L}$ si parla di iperomocisteinemia moderata, per valori superiori ai 100 $\mu\text{mol/L}$ si parla di grave iperomocisteinemia [1, 2].

Le iperomocisteinemie

Omocistinuria dovuta a deficit di cistationina- β -sintetasi (CBS): (Omocistinuria tipo I o classica)

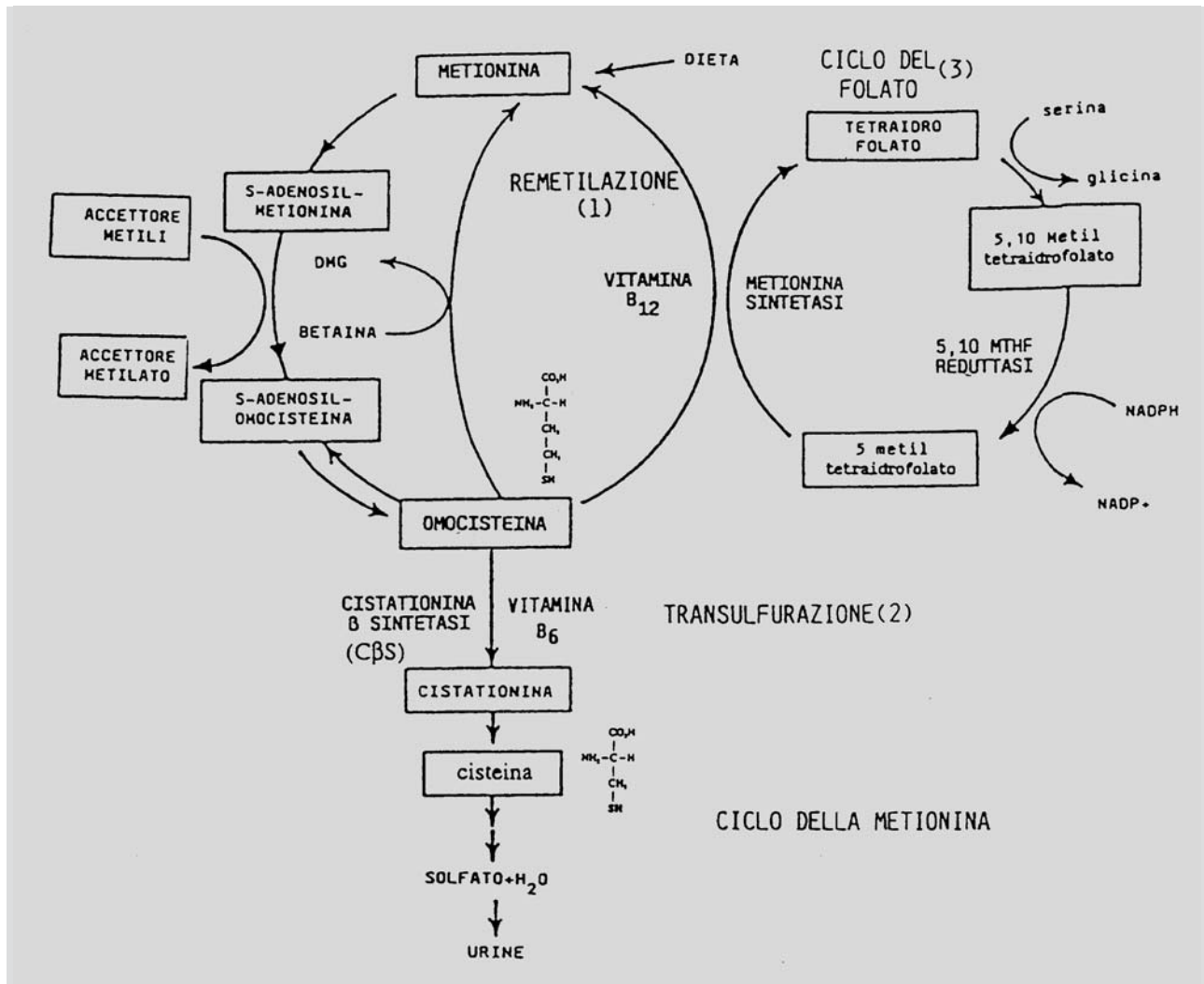
La carenza di questo enzima dà luogo ad una malattia ereditaria a trasmissione autosomica recessiva a carico del metabolismo della metionina. In base ai dati epidemiologici l'incidenza della malattia è di 1: 344.000 nati vivi ma in alcune regioni (Australia) è stata riferita una prevalenza più alta.

Il deficit di cistationina β -sintasi, enzima che, con la vitamina B6 come cofattore, converte l'omocisteina in cistationina nella via metabolica della trans-sulfurazione del ciclo della metionina, oltre all'aumento dell'omocisteina (>100 $\mu\text{mol/L}$) determina anche aumento della metionina nel sangue ed omocistinuria: le urine però devono essere esaminate appena emesse, dato che è instabile e può scomparire.

Il gene per la cistationina- β -sintetasi è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 21 e i portatori eterozigoti sono abitualmente asintomatici.

I bambini affetti da questa malattia sono normali alla nascita, hanno frequentemente pigmentazione chiara, occhi azzurri ed un peculiare arrossamento degli zigomi. La diagnosi viene posta di solito dopo i 3 anni, quando compare la sublussazione del cristallino (*ectopia lentis*) che provoca grave miopia e successivamente astigmatismo, glaucoma, cataratta, distacco retinico e atrofia ottica. L'osteoporosi generalizzata è il principale reperto radiologico. Frequente è un progressivo ritardo mentale, convulsioni (20% circa dei casi), turbe psichiatriche (50%): è stata però riscontrata un'intelligenza normale in pazienti responsivi alla vitamina B6.

Sono frequenti gli episodi tromboembolici che interessano sia i grandi che i piccoli vasi, specialmente quelli cerebrali che possono comparire a qualsiasi età. Atrofia ottica, paralisi, convulsioni, cuore polmonare ed ipertensione grave (secondaria a infarti renali) sono tra le gravi conseguenze della tromboembolia [3, 4]. Questa è dovuta a modificazioni delle pareti vascolari e ad un'aumentata attivazione piastrinica secondaria ad elevati livelli di omocisteina [5]. Il rischio di tromboembolia aumenta in seguito ad interventi chirurgici.



Accanto alla forma omozigote rarissima e grave, ha un impatto di un certo rilievo l'eterozigosi per il deficit di CBS che si riscontra in circa lo 0.5% della popolazione generale [4] e l'eterozigosi per la mutazione della CBS 844ins68, presente nel 10-15% della popolazione generale [6, 7] (tab. 1). Quest'ultima però si associa ad iperomocisteinemia se coesistono altre alterazioni genetiche o acquisite.

La *diagnosi* si può stabilire mediante il dosaggio dell'enzima in campioni di biopsia epatica, in fibroblasti coltivati o linfociti stimolati con fitoemoag-

glutinina mentre la diagnosi prenatale è attuabile eseguendo un dosaggio enzimatico sulle colture di cellule amniotiche o su villi coriali.

Alte dosi di vitamina B6 (200-1000 mg/die) determinano un notevole miglioramento nei pazienti responsivi a questa terapia. Tali soggetti, che sono circa il 40%, possiedono un'attività enzimatica residua e, di solito, presentano manifestazioni cliniche più lievi. Alcuni all'inizio della terapia possono non rispondere per la grave deplezione di folati; pertanto un paziente non dovrebbe essere considerato non

Tabella 1. - Fattori che influenzano la concentrazione ematica di omocisteina

GENETICI*

- *Anomalie di transulfurazione:* – difetto di cistationina Beta-sintetasi (cromosoma 21):
omozigote: 1/340.000 nati
eterozigote: 0,5% popolazione
- mutazione eterozigote 844ins68: 10-15% popolazione generale solo se associata ad altri fattori
- *Anomalie di rimetilazione:* – difetto di 5-10-metilentetraidrofolato reductasi (MTHFR):
omozigote: 1/3.350.000 nati
eterozigote: 0,5% popolazione
- variante termolabile della MTHFR C677T (50% di attività):
omozigote: 5-20% popolazione
- difetto di metionina-sintetasi A2756G
- difetto conversione cobalamina a metil-cobalamina (cbl C,D,E,F,G)

ETÀ/SESSO

Aumenta con l'età
Sesso maschile
Postmenopausa nella donna

NUTRIZIONALI

Deficit di folato, vitamina B₁₂: causa più frequente specie nell'anziano
Deficit di vitamina B₆
Eccessivo consumo di caffè ed alcool

MALATTIE

Intestinali: malassorbimento Vit. B₁₂
Renali: ridotta escrezione da insufficienza renale
Psoriasi: per riduzione dei folati
Leucemia linfoblastica, alcune neoplasie, insufficienza renale cronica e trapianto renale
Ipotiroidismo
Diabete
Ipertensione essenziale

FARMACOLOGICI

Metotrexate: deplezione di 5-metil-tetraidrofolato
Nitrati: antagonizzano la vitamina B₁₂
Estrogeni: causano deficit di vitamina B₆
Diuretici
Anticonvulsivanti, carbamazepina, isoniazide e fentoina: interferiscono con i folati

FARMACI CHE RIDUCONO L'OMOCISTEINA

N-acetilcisteina, penicillamina (analogo della cisteina)

* Recentemente è stata messo a punto una metodica, molto rapida, capace di tipizzare il polimorfismo di 12 genotipi coinvolti nel metabolismo dei folati e dell'omocisteina e precisamente: MTHFR C677T ed A1298C, methionine synthase (MTR) A2756G, methionine synthase reductase (MTRR) A66G, cystathionine beta-synthase (CBS) 844ins68 e C699T, transcobalamina II (TCII) C776G e A67G, reduced folate carrier-1 (RFC1) G80A, paraoxonase-1 (PON1) A575G e T163A, betaine homocysteine methyltransferase (BHMT) G742A. La metodica può facilitare studi su larga scala circa le basi genetiche dell'omocisteinemia e delle patologie associate [12].

responsivo alla vitamina B6 finché non sia stato aggiunto acido folico (5-15 mg/die) allo schema di trattamento. La restrizione dell'apporto di metionina, unitamente alla supplementazione di cisteina, è raccomandata per tutti i pazienti, indipendentemente dalla loro risposta alla vitamina B6. La betaina (trimetilglicina, 6-9 g/die, aggiustando la dose ai livelli plasmatici di omocisteina) serve come donatore di gruppi metilici per rimetilare l'omocisteina a metionina e quindi per ridurre i livelli di omocisteina nei fluidi corporei.

Questo trattamento ha prodotto un miglioramento clinico nei pazienti non responsivi alla terapia con vitamina B6. Un precoce trattamento con vitamina B6 di pazienti affetti dalla forma non responsiva ha determinato effetti molto favorevoli anche sul QI [1, 2].

Omocistinuria da difetti nella formazione di metilcobalamina (Omocistinuria tipo II)

La carenza di questo enzima dà luogo ad una malattia ereditaria a trasmissione autosomica recessiva di natura ancora ignota, dovuta a difetti nel metabolismo intracellulare della cobalamina, cofattore dell'enzima metionina sintetasi, che interferiscono sulla formazione di metilcobalamina e quindi della metionina. I cinque difetti identificati sono indicati come **cbl C**, **cbl D**, **cbl E**, **cbl F** e **cbl G**. I pazienti con i difetti **cbl E** e **cbl G** sono incapaci di formare metilcobalamina e presentano omocistinuria. Quelli con i difetti **cbl C**, **cbl D** e **cbl F** hanno associata omocistinuria ed aciduria metilmalonica perché è compromessa sia la formazione di metilcobalamina sia di adenosilcobalamina. Tutti presentano ipometioninemia, che li differenzia dal deficit di cistationina beta sintetasi, anemia megaloblastica e omocistinuria.

Il quadro clinico è caratterizzato spesso da vomito, inappetenza, letargia, ipotonia e ritardo dello sviluppo psicomotorio che possono comparire nei primissimi mesi di vita.

La *diagnosi* si effettua mediante adeguati studi su fibroblasti coltivati. Per la diagnosi prenatale si ricorre a studi su colture di cellule amniotiche.

Il *trattamento* con vitamina B12, in forma di idrossicobalamina (1-2 mg/die), è in grado di correggere i segni clinici e biochimici con risultati che variano nell'ambito di entrambe le malattie [1, 2]. A volte può risultare di una qualche utilità la betaina come su riportato.

Omocistinuria da deficit di 5-10 metilentetraidrofolato reduttasi (Omocistinuria tipo III)

L'enzima metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR) riduce il 5-10 metilentetraidrofolato a formare 5-metiltetraidrofolato che fornisce il gruppo metilico necessario alla cobalamina. Questa, una volta metilata funge da cofattore cedendo il gruppo metilico per la rimetilazione dell'omocisteina a metionina. Il gene per questo enzima è localizzato sul braccio corto del cromosoma 1. Questa patologia è trasmessa con modalità autosomica recessiva e costituisce il 5-10% di tutti i casi di omocistinuria.

Allo stato omozigote (1 caso ogni 3.355.000 nati), la gravità del difetto enzimatico e delle manife-

stazioni cliniche è variabile. Non raramente l'assenza completa dell'attività enzimatica si traduce in episodi di apnea neonatale e convulsioni miocloniche che possono condurre rapidamente a coma e morte. In altri casi sono frequenti ritardo mentale, convulsioni, microcefalia, spasticità e malattie vascolari ad insorgenza precoce.

Il deficit parziale interessa lo 0,5% della popolazione generale e può esprimersi con un quadro clinico molto variabile. Inoltre recentemente sono state individuate varie mutazioni fra cui la mutazione C677T della 5,10-metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR), associata a termolabilità dell'enzima ed attività ridotta all'incirca del 50%, con prevalenza omozigote dal 5 al 20% nelle popolazioni caucasiche studiate [7-12] (tab. 1).

In tutti i casi ora riportati, il quadro ematologico è caratterizzato da bassi livelli di metionina, ai limiti inferiori della norma e un moderato aumento della omocisteina nel sangue e nelle urine. Questo dato differenzia la malattia dall'omocistinuria classica dovuta a deficit di cistationina sintetasi mentre l'assenza di anemia megaloblastica distingue questa condizione dall'omocistinuria dovuta a formazione di metilcobalamina su riportata. La conferma diagnostica si ottiene però solo con il dosaggio dell'enzima su biopsia epatica, fibroblasti coltivati e leucociti.

I trattamenti proposti sono un'associazione di folato, nella forma di 5-metiltetraidrofolato ove disponibile, cioè nella forma ridotta utilizzata dall'organismo, vitamina B6 e vitamina B12 con supplementazione di metionina e betaina, e il trattamento precoce con betaina che sembra dare i migliori risultati [1, 2].

Omocisteina e Folati

L'associazione iperomocisteinemia e patologia vascolare, riscontrata frequentemente nei sia pur rari difetti metabolici congeniti allo stato omozigote, ha spinto vari ricercatori, fin dagli anni '60, ad approfondire e ricercare se e quali rapporti potevano esistere fra iperomocisteinemia e rischio di patologia vascolare [3, 4].

È così emerso che almeno il 20-30% dei pazienti con aterosclerosi prematura dei distretti coronarico, carotideo e periferico presenta una iperomocisteinemia moderata, che livelli plasmatici di omocisteina elevati, contribuiscono per almeno il 10% al rischio trombotico della popolazione generale [13], con possibile sinergismo in associazione ad altri fattori di rischio, come il fumo di sigaretta e l'ipertensione arteriosa [14]. Ciò ha destato grande interesse anche perché studi retrospettivi caso-controllo, cross-sezionali e metanalisi, pur richiedendo ulteriori conferme, hanno evidenziato un incremento del rischio correlato all'iperomocisteinemia da 2 a 6 volte per la patologia arteriosa e di circa 2,5 volte per quella venosa [13-16].

Inoltre sono oramai noti gli stretti rapporti tra livelli plasmatici di omocisteina e folati [11, 17, 18], tanto che il riscontro di iperomocisteinemia va considerato un indice di carenza di folato da insufficiente apporto o assorbimento. Questo è dovuto allo scarso consumo di vegetali crudi, non raro oggi nel-

la II-III infanzia, ed è particolarmente frequente nei soggetti anziani. Tale carenza subclinica di folati da insufficiente apporto, talora si associa ad un alterato assorbimento per malattie infiammatorie croniche intestinali o interferenze farmacologiche (metotrexate, anticonvulsivanti) e, nei soggetti omozigoti per la mutazione MTHFR C677T con ridotta funzione enzimatica, per la maggiore richiesta di folati perché la via della rimetilazione funzioni adeguatamente [11, 12, 17]. Tale deficit può essere riportato alla normalità o incrementando l'apporto dietetico o con supplementazioni farmacologiche, con conseguente riduzione o normalizzazione dei livelli plasmatici di omocisteina.

Per molte delle condizioni patologiche su riportate ed in particolare per la malattia vascolare aterosclerotica, l'iperomocisteinemia è considerata un nuovo fattore di rischio oltre a quelli già noti: iperlipidemia, ipertensione, obesità, diabete, abuso di fumo.

Per quanto attiene all'acido folico o acido pteroil-glutammico o vitamina B9, già negli anni '30 Lucy Willis aveva evidenziato che l'anemia macrocitica della gravida poteva trarre giovamento da un principio attivo presente nel lievito.

Nel 1941 fu isolato un composto capace di prevenire tale patologia che fu chiamato acido folico in quanto derivato dalle foglie degli spinaci: la struttura molecolare e la sintesi furono realizzate nel 1943 da Strokstad [19-21].

Successivamente è stato evidenziato che composti con 3 o 7 molecole di acido glutammico (acido pteroil-triglutammico e acido pteroil-eptaglutammico) costituiscono il 75% dell'apporto alimentare di acido folico, sono biologicamente attivi ma devono subire una idrolisi a pteroil-monoglutammico prima di essere assorbiti per cui con il termine "folati", si intende una serie di composti strutturalmente correlati con l'acido pteroilglutammico o acido folico che

rappresentano un principio vitaminico della grande famiglia del complesso vitaminico B.

Per molti anni dopo la sua scoperta, l'acido folico presente nelle verdure a foglia verde come gli spinaci ma anche nel fegato, carne, uova, asparagi, pomodori, fagioli, legumi vari, arance, ecc. (tab. 2), è stato impiegato quasi esclusivamente in ambito ematologico nelle anemie macrocitarie e/o megaloblastiche previa determinazione della concentrazione sierica dei folati.

Dall'inizio degli anni '80 sono emersi sempre più evidenti gli stretti rapporti fra carenza di folati ed un aumentato rischio di sviluppo di malformazioni del tubo neurale (NTD) quali la spina bifida e l'anencefalia, in bambini nati da donne che hanno avuto un insufficiente apporto nutrizionale di folati durante la gravidanza [22-24]. In condizioni normali, durante la gravidanza il tasso di acido folico nel sangue del cordone ombelicale è tre volte superiore a quello del sangue materno in quanto è indispensabile al feto per i suoi bisogni metabolici quali il metabolismo degli aminoacidi, delle purine e delle pirimidine, ma i valori sono molto bassi se le madri sono in una condizione di carenza di folati. Per tale motivo a tutte le gravide dal 1992 il CDC, ha consigliato di assumere, a scopo preventivo, 0,4 mg/die per tutta la durata della gestazione [25].

Poiché il 50% delle gravidanze non sono programmate, per prevenire più concretamente la suddetta patologia malformativa si è indagato per anni sull'opportunità di arricchire qualche alimento con acido folico.

I risultati scaturiti da tali indagini sono stati talmente convincenti da spingere, nel 1998, le autorità politico-sanitarie degli Stati Uniti e del Canada ad intervenire sulla popolazione generale imponendo l'integrazione o "fortificazione" delle farine di cereali con l'aggiunta di una quantità di acido folico compreso tra 0.1-0.3 mg/100 g di farina [22-24].

Tabella 2. - Contenuto di acido folico in alcuni alimenti (x100 g)

MOLTO ELEVATO 250-300 µg	ELEVATO 90-180 µg	MODERATO 50-89 µg	BASSO 20-49 µg
Fiocchi di crusca o di mais	Asparagi	Arachidi	Arance
Germe di grano	Barbabietole rosse	Carciofi	Cardi
Lievito di birra (1250 µg)	Biete	Castagne fresche	Cavolo cappuc. rosso
Soia	Broccolo a testa	Cavolfiore	Clementine
	Carciofi surgelati	Cavolo cappuc. verde	Funghi chiodini
	Catalogna	Fagioli freschi	Funghi ovuli
	Cavoli di bruxelles	Finocchio	Funghi porcini
	Cavolo broccolo verde	Lattuga	Kiwi
	Ceci secchi	Noci	Lamponi
	Fagioli secchi	Pinoli	Mandarini
	Fave	Piselli freschi	Mora
	Funghi secchi	Porri	Patate
	Germogli di soia	Zucchine	Peperoni gialli
	Indivia		Piselli in scatola
	Lenticchie		Radicchio verde
	Rucola		Ravanelli
	Scarola		Sedano
	Spinaci		Spremuta arance o pompelmo
			Verdura e legumi surgelati

Questa decisione ha determinato una riduzione dell'incidenza dei difetti del tubo neurale statisticamente significativa e ai livelli più bassi mai evidenziati.

Onde ottenere una prevenzione totale delle su citate malformazioni, nel 2003 la Società Canadese di Ostetricia e Ginecologia ed il Comitato di Genetica, hanno emanato le nuove linee guida sull'uso dell'acido folico. A tutte le gravide viene consigliata la somministrazione di un multivitaminico che contenga da 0,4 a 1 mg/die di acido folico. Nelle donne con rischio medio-alto di NTD (precedente neonato o storia familiare di tale patologie, diabete insulino-dipendente, epilessia in trattamento con acido valproico o carbamazepina), dovrebbero essere avvertite di assumere una supplementazione di acido folico di 4-5mg/die separatamente dal multivitaminico. Attenzione deve inoltre essere posta al rischio di un deficit latente di Vitamina B12 prima di iniziare la terapia [26]. Campagne di informazione devono essere realizzate per promuovere il consumo di acido folico rivolto in particolare alle giovani non sposate, obese, fumatrici, che consumano limitate quantità di frutta e verdura e che hanno un basso livello di istruzione [27].

Nel corso degli anni e grazie a numerose indagini, altre potenziali manifestazioni da carenza di folato sono emerse quali: l'iperomocisteinemia con un aumento significativo di malattie vascolari occlusive [28], già segnalate nei gravi casi di omocistinuria, alcune crisi convulsive neonatali intrattabili e responsive solo all'acido folico [29], disturbi neuropsichiatrici di tipo depressivo [30] del giovane adulto, neuropatie periferiche, degenerazione subacuta combinata del midollo spinale, demenza di Alzheimer [31], malattia di Parkinson, lo sviluppo di alcuni tipi di neoplasie e la comparsa di alterazioni preneoplastiche a carico degli epitelii gastrointestinale, della cervice uterina e del polmone [32-34].

Da quanto fin qui esposto appare evidente che la carenza di folati, un tempo considerata responsabile solo di una particolare forma di anemia, è ora riconosciuta come fattore determinante molteplici condizioni patologiche.

Aspetti fisiopatologici

I meccanismi patogenetici del danno vascolare legato all'iperomocisteinemia non sono ancora del tutto chiari. Alcuni ricercatori hanno evidenziato in pazienti omocistinurici la presenza di una condizione di stress ossidativo, con conseguente aumentata escrezione urinaria di isoprostani, correlata ad un'attivazione piastrinica in vivo (valutata dall'escrezione di metaboliti del trombossano), che sarebbe stata ridotta significativamente dalla somministrazione di vitamina E [35]. Altri studiosi inoltre avrebbero evidenziato una aumentata produzione di radicali liberi dell'ossigeno secondaria all'auto-ossidazione dell'omocisteina nel plasma, con conseguente perossidazione lipidica a livello delle membrane e delle lipoproteine circolanti, disfunzione endoteliale, attivazione piastrinica e ipercoagulabilità, tutti meccanismi pro-aterogeni e pro-trombotici [36, 37].

Sempre in ambito sperimentale, è stato più recentemente confermato che l'iperomocisteinemia determina una aumentata produzione di specie reattive

dell'ossigeno (ROS) ma anche una ridotta formazione di L-arginina e di ossido nitrico (NO), con conseguente formazione di superossido (O_2^-) [38].

In uno studio clinico randomizzato contro placebo, volto a valutare la funzione endoteliale attraverso la dilatazione flusso mediata, l'effetto deleterio sulla struttura vascolare sarebbe determinato da una aumentata produzione di superossido (O_2^-) attraverso un meccanismo biochimico che coinvolge l'ossido nitrico e, in minor misura, dall'ossidazione chimica dell'omocisteina. L'aumento del superossido danneggerebbe inoltre la funzione degli enzimi cellulari antiossidanti quali la glutatione perossidasi e la superossido dismutasi extracellulare con peggioramento del danno ossidativo [39].

L'iperomocisteinemia pertanto indurrebbe un danno vascolare per stress ossidativo in quanto aumenta le ROS e, almeno in parte, riduce la produzione di NO a livello endoteliale vasale [40].

È stato infatti evidenziato che l'omocisteina in condizioni normali reagisce con l'ossido nitrico (NO), fattore di rilassamento endoteliale e principale determinante delle proprietà antiaterosclerotiche dell'endotelio, formando un nitroso-tiolo dotato di attività vasodilatatrice che prolunga la breve azione dell'NO. La biosintesi di NO si realizza ad opera dell'enzima "ossido nitrico-sintetasi" (eNOS) che a sua volta regola il tono vascolare [41, 42].

In condizioni di stress ossidativo però, la struttura dell'enzima eNOS si altera e diventa produttore di anione superossido (O_2^-) che sottrae NO, già deficitario, per produrre perossinitrito, ossidante altamente citotossico. Inoltre un eccesso di omocisteina non è più totalmente neutralizzata da NO, subisce il processo di autoossidazione ad omocistina, che genera nel contempo i prodotti reattivi dell'ossigeno. Lo stress ossidativo innesca la inversione di eNOS da produttore di NO a generatore di anione superossido, accentuando lo stress ossidativo [34, 41-42].

L'esposizione all'omocisteina dell'endotelio vasale risulta pertanto lesivo, per l'azione diretta sull'endotelio e sulla parete vasale con marcato effetto aterogeno, ma anche per l'azione sulle piastrine, con aumento della adesività ed aggregabilità piastrinica e per l'azione sui fattori della coagulazione e sulle lipoproteine con riduzione dell'attività dell'antitrombina III, riduzione dell'attivazione della proteina C, attivazione del fattore VII, riduzione dell'attività del PTA. Anche l'ossidazione delle LDL, la formazione del composto omocisteina-tiolattone la cui sintesi è proporzionata ai livelli di omocisteina, e la formazione di omocistamina-LDL svolgono un'azione tossico-aterogena di tipo ossidativo sull'endotelio vasale [43, 44].

Un esempio di infarto miocardico in giovane età in paziente con iperomocisteinemia misconosciuta è illustrato nella figura 2. Si tratta di un soggetto maschio di 23 anni, giocatore dilettante di calcetto, razza caucasica, con familiarità per infarto miocardico (padre). I dati ematochimici mostravano, come unico dato alterato, oltre agli enzimi cardiocompetenti, un valore elevato di omocisteinemia (34.6 mcg/mL; vn <10). Il giovane venne ricoverato per sindrome coronarica acuta con ST sopraslivellato nelle derivazioni inferiori. La coronarografia non mostrava lesioni coronariche epicardiche. Tuttavia, la scintigra-

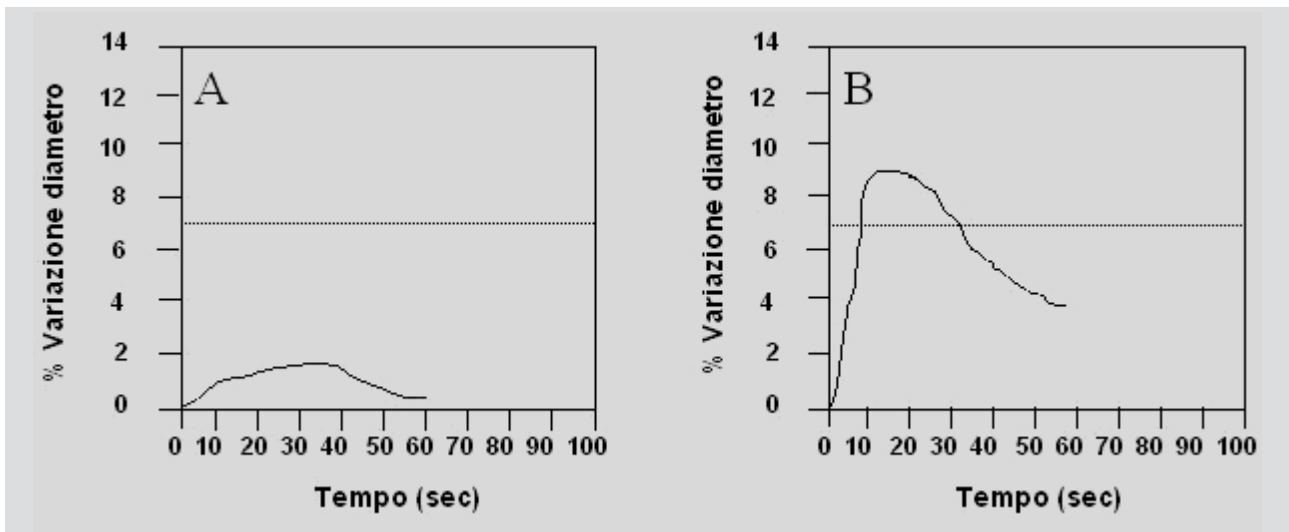


Figura 2. - Giovane di 23 anni, BMI 29.4 Kg/m², viene ricoverato per sindrome coronarica acuta con ST sopraslivellato in D2, D3, AVF e movimento enzimatico specifico. L'ecocardiogramma non mostra alterazioni della cinetica segmentaria. La scintigrafia gated-SPECT mostra deficit di perfusione anterolaterale parziale reversibile con normale funzione sistolica globale. La coronarografia non evidenzia lesioni coronariche stenotiche. Tuttavia, come mostrato in figura A, la risposta vasomotoria endotelio-dipendente dell'arteria brachiale è chiaramente patologica (1.19%, $v_n > 7\%$). Dopo un ciclo di riabilitazione cardiologica ambulatoriale (intensità 70% del VO₂ max, 3 sedute settimanali per 8 settimane), la risposta vasomotoria endotelio-dipendente si normalizza (9.5%), e così il livello plasmatico di omocisteina (da 34.6 mcg/mL a 9.2 mcg/mL; $v_n < 10$).

La miocardica gated-SPECT evidenziava deficit di perfusione parzialmente reversibile in sede anterolaterale con normale frazione d'eiezione e normale funzione contrattile. La funzione endoteliale, valutata mediante risposta iperemica dell'arteria brachiale, era severamente alterata. È frequente l'associazione disfunzione endoteliale-iperomocisteinemia, e la prognosi avversa dei pazienti con persistenti livelli ematici di omocisteinemia > 10 mcg/mL. Lo spessore intimale dell'arteria carotide comune era patologico (1 mm). Il paziente, dopo un programma di cardiologia riabilitativa ambulatoriale di intensità pari al 70% del VO₂max predetto, 3 volte alla settimana per 8 settimane, ha ridotto i valori di omocisteinemia fino a 9.2 mcg/mL, e la risposta vasomotoria dell'arteria brachiale si è normalizzata. Quindi, in questo paziente, il miglioramento della funzione endoteliale si è associato alla normalizzazione dei valori plasmatici di omocisteinemia. Dopo 1 anno, l'omocisteinemia è rimasta nel range di normalità, ed anche la funzione endoteliale rimane nella norma. Il paziente ha continuato ad effettuare attività fisica aerobica per 40 minuti 2-3 volte alla settimana, ponendo attenzione a mantenere elevata l'assunzione giornaliera di cibi ricchi di acido folico. In questo caso, il miglioramento della funzione endoteliale e la normalizzazione dei livelli plasmatici di omocisteina sono stati ottenuti senza terapia con acido folico, ma soltanto con un programma riabilitativo. Tale dato conferma i risultati di uno studio in precedenza effettuato su pazienti con cardiopatia ischemica sottoposti a un programma riabilitativo simile a quello effettuato nell'esempio soprariportato [69]. Il meccanismo con cui il training riduce i livelli plasmatici di omocisteina può essere duplice. Da un lato, il training aumenta l'espressione di ossido nitrico sintetasi endoteliale (e-NOS), con conseguente aumento dell'attività biologica dell'ossido nitrico [70]. Tale aumento si traduce in un'accentuazione della risposta dilatatoria arteriosa all'infusione di acetilcolina, e in un aumento della risposta vasomotoria

endotelio-dipendente dell'arteria brachiale [71-74]. Dall'altro, il training fisico aumenta l'attività dell'enzima superossido dismutasi, in particolare modo della subunità extracellulare (ec-SOD), che si traduce in una ridotta reazione di inattivazione dell'ossido nitrico da parte degli anioni superossido [75]. In altri termini, il training fisico agisce come sistema antiossidante, in quanto riduce l'azione deleteria di radicali liberi come l'anione superossido, e tale azione determina miglioramento dell'azione biologica dell'ossido nitrico, sia attraverso l'aumento della sintesi endogena, sia attraverso una ridotta inattivazione da parte dei radicali liberi implicati.

La somministrazione di folato, in particolare nella forma di 5-metiltetraidrofolato, cioè nella forma ridotta utilizzata dall'organismo, a dosi fisiologiche pari a 0,1-4 mg/die riduce l'iperomocisteinemia mentre a dosi superiori, secondo alcuni comprese fra i 15-50 mg [34, 45-47] sembra migliorare la disfunzione endoteliale in quanto oltre a regolare i livelli di omocisteina, stabilizza l'enzima eNOS mediante una specifica azione antiossidante, riporta l'eNOS alla struttura corretta aumentando la sua produzione di NO, e riduce la produzione dell'anione superossido da parte dell'eNOS [48-54]. Secondo alcuni poiché l'emivita del 5-metiltetraidrofolato nell'organismo umano è molto lunga, si potrebbe ricorrere ad una terapia intermittente costituita da un mese di trattamento a 15 mg/die ogni 2 o 3 mesi di pausa [34, 55, 56]. Va però rilevato che deve essere usato il folato nella forma di 5-metiltetraidrofolato, cioè nella forma utilizzata dall'organismo che offre il vantaggio di una biodisponibilità maggiore.

Inoltre è meno soggetta a variabilità interindividuale rispetto all'acido folico, supera il problema del mascheramento di una carenza sub-clinica di vitamina B12, possibile con l'acido folico che, essendo metabolizzato direttamente da didrofolato a tetraidrofolato, "by-passa" la tappa di conversione del 5-MTHF a tetraidrofolato che richiede vitamina B12. Infine previene l'accumulo della forma di aci-

do folico pteroilmonoglutamato che potrebbe svolgere effetti avversi su alcuni metabolismi in cui l'acido folico è coinvolto [57].

Omocisteina e Rischio Cardiovascolare

Negli ultimi 10 anni, è emersa l'evidenza scientifica che elevati livelli ematici di omocisteina sono associati ad un aumentato rischio di aterosclerosi e di eventi ischemici cardiocircolatori. Nonostante tale evidenza, tuttavia, rimangono ancora dubbi circa il meccanismo con cui l'omocisteina agisce in senso pro-aterogeno, e non appare ancora chiaro se la riduzione del livello ematico di omocisteina mediante intervento farmacologico sia associato ad una parallela riduzione del rischio cardiovascolare.

La concentrazione ematica di omocisteina è elevata in circa 1/3 dei pazienti con aterosclerosi documentata, e livelli superiori a 15 $\mu\text{mol/L}$ si associano ad un rischio 3 volte più elevato di infarto miocardico acuto [58, 59]. Tuttavia, è stato dimostrato che la concentrazione plasmatica di omocisteina tende a variare nel tempo, in relazione al livello di attività fisica, alla dieta e all'assunzione di preparati a base di vitamina B6-B12 e folati [60]. È stata avanzata l'ipotesi che livelli elevati di omocisteina nel sangue osservati in numerosi studi caso-controllo siano la conseguenza, e non la causa, di un evento acuto cardiovascolare. I livelli di omocisteina aumentano dopo infarto miocardico o dopo ictus cerebrale in conseguenza del danno tissutale [61-63]. Tuttavia, è anche vero che la persistenza di valori di omocisteina elevati nel tempo aumenta il rischio di un nuovo evento acuto.

I risultati di uno studio meta-analitico su 16786 soggetti di 56 ± 9 anni, dopo aggiustamento degli altri fattori di rischio cardiovascolare, ha evidenziato che una riduzione del 25% del livello ematico di omocisteina si associava ad una riduzione dell'11% del rischio di eventi coronarici acuti (OR 0,89, 95%CI 0,83-0,96) e del 19% di ictus cerebrale (OR 0,81, 95%CI 0,69-0,95) (64). Tuttavia, l'aumento del livello ematico di omocisteina ha un valore predittivo modesto in soggetti sani, e le raccomandazioni dell'Adult Treatment Panel III (ATP III) più recente non considerano la necessità di intraprendere una terapia farmacologica nei casi di iperomocisteinemia [65].

Studi sperimentali dimostrano che numerosi possono essere i meccanismi con cui l'omocisteina favorisce l'aterosclerosi. La funzione endoteliale appare depressa in soggetti con iperomocisteinemia, e il deficit endoteliale si correla con i livelli plasmatici di omocisteina [66]. Altri meccanismi sono il potenziamento della desquamazione endoteliale, l'ossidazione delle LDL, l'aumento dell'adesione di monociti alla parete vasale, la ridotta sintesi di ossido nitrico, l'iperaggregabilità piastrinica e l'attivazione dei fattori della coagulazione [67, 68]. Poiché la vitamina B6, B12 e i folati rappresentano cofattori e coenzimi implicati nei processi di remetilazione e trans-sulfurazione dell'omocisteina, la loro somministrazione nei casi di iperomocisteinemia è stata valutata in vari studi. La somministrazione orale di vitamina B6 (2 mg/die)-B12 (6 μg) e di folati (400 μg) si è dimostrata in grado di ridurre il livello pla-

smatico di omocisteina in casi di iperomocisteinemia. In una metanalisi di 12 studi su 1114 soggetti di età compresa tra 23 e 75 anni (media 52), la somministrazione di acido folico a dosi comprese tra 0.5 e 10 mg/die hanno ridotto la concentrazione ematica di omocisteina del 25% (95%CI 23-28%, $P < 0.001$), senza differenze significative per dosi comprese tra 0.5 e 5 mg/die. La durata del trattamento è stata di 3-12 settimane. L'aggiunta di vitamina B12 (0.5 mg/die) ha determinato un ulteriore calo della omocisteinemia del 7% (95%CI 3-10%), mentre la vitamina B6 (16.5 mg/die) non ha esercitato alcun significativo effetto additivo. Una precedente metanalisi basata su studi osservazionali aveva dimostrato che la riduzione prolungata della concentrazione ematica di omocisteina pari a 3-4 $\mu\text{mol/L}$ in soggetti sani si associava ad una riduzione del rischio di eventi vascolari del 30-40%. Tuttavia, non è chiaro se la riduzione della omocisteinemia in pazienti con cardiopatia o encefalopatia documentate sia associata ad una significativa riduzione del rischio di recidive. Sono necessari studi più ampi per dimostrare che la riduzione dei livelli ematici di omocisteina ottenibili con supplementazione orale di acido folico e vitamina B12 si traduca in una riduzione della incidenza di eventi ischemici coronarici e cerebrali, soprattutto nei pazienti con cardiopatia ischemica e/o encefalopatia cerebrovascolare documentate.

Conclusioni

Il folato o "Vitamina B9", dal momento della sua scoperta come fattore protettivo contro l'anemia macrocitica, ha, nel corso degli anni, stimolato l'interesse di numerosi studiosi. È stato così evidenziato non solo il suo coinvolgimento nelle reazioni di sintesi degli acidi nucleici (DNA e RNA) e la sua stretta correlazione con la vitamina B12, ma anche nelle malattie vascolari tromboemboliche, nelle malattie cardiovascolari, associato secondo alcuni alla vitamina B12 [69, 70], nella depressione [30], molto verosimilmente nella demenza senile e nell'Alzheimer [31, 72-74], in alcune forme neoplastiche dell'intestino [75]. Il suo deficit nell'insorgenza delle anomalie del tubo neurale, oramai noto da tempo, ha suggerito la fortificazione delle farine di più comune impiego per aumentare, in tutta la popolazione comprese le donne con possibile gravidanza non programmata (50%), i bassi livelli nell'organismo di tale vitamina secondari soprattutto allo scarso consumo di legumi, vegetali e frutta.

Infatti mangiando normalmente pasta, riso, pane, carne, pesce, uova, latte, si introducono circa 100 microgrammi di acido folico: devono pertanto essere introdotti altri 300 microgrammi circa per soddisfare il fabbisogno del soggetto normale. In tale condizione è sufficiente mangiare a pranzo una porzione di insalata tipo lattuga (70 g = 45 mcg) e una porzione di zucchine a cena (300 g = 156 mcg), oppure una porzione di insalata mista a pranzo (80 g = 15 mcg) e una porzione di spinaci a cena (250 g = 375 mcg) per mantenere livelli sierici di 5-10 nanogrammi/ml in forma di acido metil-tetraidrofolico (tab. 2). Non sempre però questo avviene e condizioni di deficit di acido folico, con conseguente iperomocisteinemia, si verificano inoltre per assunzio-

ni di farmaci quali fenitoina, barbiturici, anticoncezionali, diarrea grave e/o cronica, processi infiammatori e/o malassorbimento intestinale, aumentato fabbisogno come nella gravidanza, nelle malattie emolitiche, nelle emorragie, nelle leucemie o malattie mieloproliferative, nelle cirrosi epatiche, ecc. e molto verosimilmente nel soggetto anziano per ridotto apporto o scarso assorbimento.

Attualmente il nesso causale tra iperomocisteinemia moderata e danni vascolari è ipotizzabile in base ad un gran numero di dati epidemiologici [15, 28, 75, 76] ma sarà definitivamente provato da una serie di studi prospettici, randomizzati, in doppio cieco, di intervento con folato e altre vitamine del gruppo B, che sono tuttora in corso e si propongono di verificare se il supplemento di folato è in grado di prevenire i danni vascolari [28]. Questi studi sono stati pianificati alcuni anni fa quando si riteneva che l'intervento del folato fosse limitato all'abbassamento dell'omocisteina, ma ora è noto che il folato può migliorare la funzione endoteliale, e quindi esplicare azione antiaterosclerotica, con meccanismi indipendenti dall'omocisteina [48-52]. Ma la dose di folato che consente di migliorare la funzione endoteliale è generalmente superiore a quella sufficiente per controllare l'omocisteina [45, 46, 49, 50]. Ora, nei grandi trials in corso, la dose di folato varia da 0,4 a 2 mg, sufficiente per abbassare l'omocisteina ma non idonea ad esplicare una piena azione sulla funzione endoteliale. Quindi questi studi potrebbero essere inconclusivi se risultasse che l'intervento con folato abbassa l'omocisteina ma non risolve la mortalità e morbilità vascolare, perché la dose di folato è stata calibrata sull'azione di riduzione dell'omocisteina e non sull'effetto di miglioramento della funzione endoteliale [77].

Nel frattempo il provvedimento di fortificare le farine con folato per prevenire i disturbi di chiusura del tubo neurale coinvolge oltre 400 milioni di persone nel continente americano. Questo esteso campione (6% della popolazione mondiale) potrà fornire dati utili non solo sulla prevenzione dei disturbi del tubo neurale ma anche sulla prevenzione di malattie croniche altamente invalidanti e considerate tra le prime cause di morte nei paesi industrializzati come i disturbi cardiovascolari, l'ictus, la demenza e alcune forme di neoplasia.

I folati quindi rientrano nell'ambito dei "functional foods" o dei "nutrigenomics" in quanto condizionando il polimorfismo di singoli nucleotidi di parecchi geni condizionano il rischio e/o la protezione di alcune patologie. La fortificazione con un composto che non è un coenzima naturale può però dar luogo, a lungo termine, ad effetti biologici indesiderati anche gravi, come rilevato recentemente [57]. Somministrando la forma naturale attiva dell'acido folico, cioè il MTHF, tale evenienza non si verifica, si possono usare dosi elevate (15 mg di MTHF) che svolgono azione terapeutica e si possono superare tranquillamente la dose di 1000 microgrammi/die indicato dalla FDA al di sopra del quale con l'acido folico può esservi anche il rischio di mascheramento dei danni conseguenti ad un'eventuale carenza di vitamina B12 [78].

Tuttavia, non è ancora chiaro se la riduzione della omocisteinemia in pazienti con cardiopatia o en-

cefalopatia documentate sia associata ad una significativa riduzione del rischio di recidive. Sono necessari studi più ampi per dimostrare che la riduzione dei livelli ematici di omocisteina ottenibili con supplementazione orale di acido folico e vitamina B12 si traduca in una riduzione della incidenza di eventi ischemici coronarici e cerebrali, soprattutto nei pazienti con cardiopatia ischemica e/o encefalopatia cerebrovascolare documentate.

Riassunto

Negli ultimi 10 anni, è emersa l'evidenza scientifica che elevati livelli ematici di omocisteina sono associati ad un aumentato rischio di aterosclerosi e di eventi ischemici cardiocircolatori. Nonostante tale evidenza, tuttavia, rimangono ancora dubbi circa il meccanismo con cui l'omocisteina agisce in senso pro-aterogeno, e non appare ancora chiaro se la riduzione del livello ematico di omocisteina mediante intervento farmacologico sia associato ad una parallela riduzione del rischio cardiovascolare.

Studi sperimentali dimostrano che numerosi possono essere i meccanismi con cui l'omocisteina favorisce l'aterosclerosi. La funzione endoteliale appare depressa in soggetti con iperomocisteinemia, e il deficit endoteliale si correla con i livelli plasmatici di omocisteina. Il training fisico riduce i livelli plasmatici di omocisteina e migliora la funzione endoteliale. Tuttavia, non sono documentati miglioramenti della prognosi.

Sono necessari studi più ampi per dimostrare che la riduzione dei livelli ematici di omocisteina ottenibili con supplementazione orale di acido folico e vitamina B6 and B12 si traduca in una riduzione della incidenza di eventi ischemici coronarici e cerebrali, soprattutto nei pazienti con cardiopatia ischemica e/o encefalopatia cerebrovascolare documentate.

Parole chiave: iperomocisteinemia, aterosclerosi vascolare, fattori di rischio cardiovascolare, acido folico, 5-metiltetraidrolfolato.

Bibliografia

1. Rezvani I. Metionina. in Nelson: Trattato di Pediatria. Edizioni Minerva Medica. XVI Ed. 2002; X-82.3: 350-52.
2. Mudd SH, Levy HL, Kraus J. Disorders of Transsulfuration. In: The metabolic & molecular bases of inherited Diseases VIII Ed. Mc Grow Hill 2001; 88: 2008-48
3. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 11-28.
4. Mudd SH, Skovby R, Levy HL, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine-Beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 1-31.
5. Davì G, Di Minno G, Coppola A, et al. Oxidative Stress and Platelet Activation in Homozygous Homocystinuria. *Circulation* 2001; 104: 1: 124.
6. Sebastio G, Sperandio MT, Panico M, et al. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine-Beta-synthase deficiency in Italian families and report of four novel mutations. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1324-33.
7. Coppola A, De Simone C, Coppola D, et al. Omocisteina, folati e patologia tromboembolica. *Riv I Ost Gin* 2004; 1: 13-19.
8. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in

- methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-3.
9. de Franchis R, Mancini FR, D'Angelo A, *et al.* Elevated total plasma homocysteine and 677->T mutation of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene in thrombotic vascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 262-4.
 10. D'Angelo A, Coppola A, Madonna P, *et al.* The role of vitamin B12 in fasting hyperhomocysteinemia and its interaction with the homozygous C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. A case-control study of patients with early-onset thrombotic events. *Thromb Haemost* 2000; 83: 563-70.
 11. De Franchis R, Fermo I, Mazzola G, *et al.* Contribution of the cystathionine beta-synthase gene (844ins68) polymorphism to the risk of early-onset venous and arterial occlusive disease and of fasting hyperhomocysteinemia. *Thromb Haemost* 2000; 84: 576-82.
 12. Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM. High-level multiplex genotyping of polymorphisms involved in folate or homocysteine metabolism by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin Chem* 2004; 50: 391-402.
 13. Motulsky A. Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects and folic acid. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 17-20.
 14. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, *et al.* Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: the European Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277: 1775-81.
 15. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, *et al.* A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274: 1049-57.
 16. den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, *et al.* Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998; 80: 874-7.
 17. Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, *et al.* Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 1996; 98: 2174-83.
 18. Kluijtmans LA, Young IS, Boreham CA, *et al.* Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood* 2003; 101: 2483-8.
 19. Willis L, Mehta MM. Studies in "pernicias anaemia" of pregnancy, I preliminary report. *Indian Journal of Medical Research* 1930; 17: 777-15.
 20. Willis L. Treatment of "pernicias anaemia of pregnancy" and "tropical anaemia" with special reference to yeast extract as curative agent. *Br Med J* 1931; 1: 1059-63.
 21. Angier RB, Boothe JH, Hutchings BL, *et al.* Synthesis of a compound identical with the L. casei factor isolated from liver. *Science* 1945; 102: 227-30.
 22. Feldkamp M, Friedrichs M, Carey JC. Decreasing prevalence of neural tube defects in Utah, 1985-2000. *Teratology* 2002; 66 S.1: S23-8.
 23. Persad VL, Van den Ho/MC, Dubé IM, *et al.* Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification. *CMAJ* 2002; 167: 241-6.
 24. Ray JG, Meier C, Vermeulen MJ, Boss S, *et al.* Association of neural tube defects and folic acid food fortification in Canada. *Lancet* 2002; 360: 2047-8.
 25. Erickson JD. Folic acid and prevention of spina bifida and anencephaly. 10 years after the U.S. Public Health Service recommendation. *MMWR Recomm Rep* 2002; 51: 1-3.
 26. Wilson RD, Davies G, Desilets V, *et al.* The use of folic acid for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. Genetics Committee and Executive and Council of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. *J Obstet Gynaecol Can* 2003; 25: 959-73.
 27. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. Knowledge and use of folic acid among women of reproductive age - Michigan, 1998. 2001 Mar 16; 50: 185-9.
 28. Hankey CI, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354: 407-15.
 29. Torres OA, Miller VS, Buist NM, Hyland K. Folinic acid-responsive neonatal seizures. *J Child Neurol* 1999; 14: 529-32.
 30. Taylor MJ, Carney S, Geddes J, Goodwin G. Folate for depressive disorders. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; (2): CD003390.
 31. Malouf R, Grimley Evans J, Areosa Sastre A. Folic acid with or without vitamin B12 for cognition and dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 4: CD0045 14.
 32. Green R, Miller JW. Folate deficiency beyond megaloblastic anemia: hyperhomocysteinemia and other manifestations of dysfunctional folate status. *Seminars in Hematology* 1999; 36: 47-51.
 33. Giovannucci E.: Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia. A review. *J Nutr* 2002; 132: 2350-5.
 34. Coppola A, Di Mimmo G. L'uso farmacologico dei folati: prospettive attuali. *Riv It Ost Gin* 2004; 1: 21-25.
 35. Davi G, Di Minno G, Coppola A, *et al.* Oxidative stress and platelet activation in homozygous homocystinuria. *Circulation* 2001; 104: 1124-28.
 36. Coppola A, Davi G, De Stefano V, *et al.* Homocysteine, coagulation, platelet function and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:243-54.
 37. Welch CN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 1042-50.
 38. Jin L, Abou-Mohamed G, Caldwell RB, Caldwell RW. Endothelial cell dysfunction in a model of oxidative stress. *Med Sci Monit* 2001; 7: 585-91.
 39. Weiss N, Heydrick SJ, Postea O, *et al.* Influence of hyperhomocysteinemia on the cellular redox state-impact on homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 1455-61.
 40. Tsen CM, Hsieh CC, Yen CH, Lau YT. Homocysteine altered ROS generation and NO accumulation in endothelial cells. *Chin J Physiol* 2003; 46: 129-36.
 41. Covers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: 193-6.
 42. Verhaar MC, Stroes E, Rabelink TJ. Foliates and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 6-13.
 43. Ferretti G, Bacchetti T, Marotti E, Curatola G. Effect of homocysteinylation on human high-density lipoproteins: a correlation with paraoxonase activity. *Metabolism* 2003; 52: 146-51.
 44. Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, *et al.* Effect of homocysteinylation of low density lipoproteins on lipid peroxidation of human endothelial cells. *J Cell Biochem* 2004; 92: 51-60.
 45. Cianciolo C, Manna C, Isola E, *et al.* Effects of 5-MTHF therapy on hyperhomocysteinemia in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 9-13.
 46. Buccianti C, Raselli S, Baragetti I, *et al.* 5-methyltetrahydrofolate restores endothelial function in uraemic patients on convective haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 857-61.
 47. Assanelli D, Bonanome A, Pezzini A, *et al.* Folic acid and Vitamin E supplementation effects on homocysteinemia, endothelial function and plasma antioxidant capacity in young myocardial infarction patients. *Pharmacol Res* 2004; 49: 79-84.
 48. Stroes ESG, van Faassen EE, Yo M, *et al.* Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 2000; 86: 1129-34.
 49. Verhaar MC, Wever RMR, Kastelein JJP, *et al.* 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 97: 237-41.
 50. Doshi SN, McDowell FW, Moat SJ, *et al.* Folic acid improves endothelial function in coronary artery disease via mechanisms largely independent of homocysteine lowering. *Circulation* 2002; 105: 22-6.

51. Das UN. Folic acid says No to vascular diseases. *Nutrition* 2003; 19: 686-90.
52. Hyndman ME, Verma S, Rosenfeld RJ. Interaction of 5-methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin on endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: 2167-72.
53. Reazk BM, Haenen CR, van der Vijgh WJ, Bast A. Tetrahydrofolate and 5-methyltetrahydrofolate are folates with high antioxidant activity. Identification of the antioxidant pharmacophore. *FEBS Lett* 2003; 555: 601-5.
54. Coppola A, Mazzola C, Fermo I, et al. Homocysteine-lowering effects and reduction of oxidative stress by 5-methyltetrahydrofolate (Prefolic) in subjects with 677TT methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotype. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26 (S1): 123-7.
55. Santi R, Demicheli M, Contino L, et al. Homocysteine plasma levels after suspension of vitamin treatment. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1330-4.
56. Saban-Ruiz J, Bajo-Martinez A, Bernal Morell E, et al. Is it possible to manage hyperhomocysteinemia with an intermittent therapy? Preliminary results. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26 (S1): 118-22.
57. Lucock M. Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *BMJ* 2004; 328: 211-214.
58. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: the European Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277: 1775-81.
59. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 230-6.
60. Clarke R, Daly L, Robinson K, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149-55.
61. Egerton W, Silberberg J, Crooks R, Ray C, Lijuan X, Dudman N. Serial measures of plasma homocysteine after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1996; 77: 759-61.
62. Howard VJ, Sides EG, Newman GC, Cohen SN, Howard G, Malinow MR, Toole JF. Changes in plasma homocysteine in the acute phase after stroke. *Stroke* 2002; 33: 473-8.
63. Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS. Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation* 1999; 99: 1156-60.
64. Fryer R, Wilson B, Gubler D, Fitzgerald L, Rodgers G. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993; 13: 1327-33.
65. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation* 2002; 17/24: 3144-3421.
66. McKay DL, Perrone G, Rasmussen H, Dallal G, Blumberg JB. Multivitamin/mineral supplementation improves plasma B-vitamin status and homocysteine concentration in healthy older adults consuming a folate-fortified diet. *J Nutr* 2000; 130: 3090-6.
67. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 1998; 316: 894-8.
68. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274: 1049-57.
69. Quinlivan EP, McPartlin J, McNulty H, et al. Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease. *Lancet* 2002; 359: 227-8.
70. Bailey LB, Duhaney RL, Maneval DR, et al. Vitamin B12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *J Nutr* 2002; 132: 1872-8.
71. Quinlivan EP, Gregory JF.: Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *AJCN* 2003; 77: 221-225.
72. Malouf R, Grimley Evans J, Areosa Sastre A. Folic acid with or without vitamin B12 for cognition and dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 4: CD0045 14.
73. Morris MS. Homocysteine and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2003; 2: 425-8.
74. Sachdev P. Homocysteine and neuropsychiatric disorders. *Rev Bras Psiquiatr* 2004; 26: 50-6.
75. Bailey LB. Folate, Methyl-Related Nutrients, Alcohol, and the MTHFR 677CT Polymorphism Affect Cancer Risk: Intake Recommendations. Supplement: International Research Conference on Food, Nutrition and Cancer. *J Nutr* 2003; 133: 3748S-53S
76. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, et al. Homocysteine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999; 131: 363-75.
77. Ueland PM, Refsum H, Beresford SAA, et al. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 324-8.
78. Van Dijk, RAJM, Rauwerda JA, Steyn M, et al. Long term homocysteine-lowering treatment with folic acid plus pyridoxine is associated with a decreased blood pressure but not with improved brachial artery endothelium-dependent vasodilatation or carotid artery stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 2072-8.