

OMOCISTEINA, FOLATI E PATOLOGIA TROMBOEMBOLICA.

Antonio Coppola, Ciro De Simone, Daniela Coppola*, Ernesto Cimino, Giovanni Di Minno.

Centro di Coordinamento Regionale per le Emocoagulopatie, Dip. di Medicina Clinica e Sperimentale; *Dip. di Pediatria; Università "Federico II", Napoli.

Indirizzo per corrispondenza: Dott. Antonio Coppola

Centro di Coordinamento Regionale per le Emocoagulopatie Dip. di Medicina Clinica e Sperimentale

Via S. Pansini, 5 - 80131 Napoli - tel: +39 081 7462317; fax: +39 081 5466152; e-mail: antocopp@unina.it

ABSTRACT

The role of hyperhomocysteinemia as a risk factor for cardiovascular disease is still debated, whereas the relationships between homocysteine and folate are well established, in terms of an inverse correlation between their plasma levels and of homocysteine-lowering effects following folate supplementation. These effects are more relevant in subjects carrying genetic abnormalities of the enzymes of homocysteine metabolic pathway, in particular the common (5-20% in the general population) homozygous thermolabile 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T). Therefore folate levels play a role in the phenotype-genotype modulation of these abnormalities. The ongoing clinical trials addressing the effect of folate supplementation on vascular risk will provide important data concerning the real role of homocysteine in cardiovascular disease.

Moreover, several recent data show cardiovascular protective effects of folate, beyond homocysteine-lowering, involving antioxidant mechanisms, such as improvement of nitric oxide generation and modulation of endothelial and platelet function. These data provide further evidence for oxidative stress as a mechanism of homocysteine-related vascular injury and support a wider role for folate in the strategies of prevention of cardiovascular risk.

Key words: *homocysteine, folate cardiovascular disease, CBS*

RIASSUNTO

Il ruolo dell'iperomocisteinemia quale fattore di rischio cardiovascolare è ancora dibattuto, mentre è ben chiaro il rapporto con i folati, sia per la relazione inversa dei livelli plasmatici di omocisteina con quelli di tale vitamina, che per gli effetti di riduzione dell'omocisteinemia dopo supplementazione con folati. Entrambi questi dati sono più evidenti nei portatori di anomalie genetiche degli enzimi della via metabolica, in particolare della frequente (5-20% della popolazione generale) omozigosi per la variante termolabile della 5,10 metilentetraidrolatoredattasi (MTHFR C677T); ciò conferisce ai folati un ruolo importante nella modulazione dell'espressione fenotipica di tali alterazioni geniche. Gli studi

osservazionali in corso con utilizzo dei folati nella prevenzione cardiovascolare primaria e secondaria forniranno una risposta importante sul ruolo dell'omocisteina nella patogenesi dell'aterotrombosi. Accanto a ciò, molti dati sottolineano un ruolo protettivo dei folati nella patologia vascolare che va oltre gli effetti sull'omocisteina, evidenziandone le proprietà antiossidanti, in particolare nei confronti della produzione di ossido nitrico e della modulazione della funzionalità endoteliale e piastrinica. Questi dati forniscono ulteriori prove a sostegno dello stress ossidativo quale meccanismo di danno vascolare correlato all'iperomocisteinemia e assegnano ai folati un ruolo ricco di interessanti sviluppi tra le strategie di prevenzione della patologia vascolare.

Parole chiave: *omocisteina, folati, patologia cardiovascolare, CBS*

INTRODUZIONE

Il ruolo dell'iperomocisteinemia quale fattore di rischio cardiovascolare è tuttora controverso, sia alla luce dei dati epidemiologici non sempre univoci, sia per le incognite relative ai suoi potenziali meccanismi aterogeni e trombogenici (1, 2). Tuttavia, l'interesse clinico e scientifico nei confronti di tale anomalia metabolica resta estremamente vivo per la stretta correlazione che lega i livelli plasmatici di omocisteina con quelli di folati. Una correlazione che si evidenzia a due livelli: da un lato i folati rappresentano uno dei più importanti determinanti dei livelli di omocisteina, evidenziandosi una chiara correlazione inversa tra i loro livelli plasmatici (3); dall'altro, la supplementazione dietetica e farmacologica con folati si è ampiamente dimostrata in grado di ridurre significativamente i livelli plasmatici di omocisteina (4), rendendo pertanto disponibile una possibile strategia di prevenzione del rischio cardiovascolare facilmente accessibile e accetta per i pazienti, poco costosa e praticamente priva di effetti collaterali. E proprio dai risultati di ampi trials prospettici in corso con supplementazione di folati (e vitamine del gruppo B in genere) per la prevenzione cardiovascolare primaria e secondaria si potranno avere risposte importanti sul reale impatto dell'omocisteina nel rischio di patologia vascolare. Non esistono dati specifici relativi al ruolo dell'iperomoci-

steinemia nella patologia tromboembolica in gravidanza. Oltre al fatto che i livelli plasmatici di omocisteina tendono a ridursi nelle donne gravide rispetto alle non gravide va inoltre considerato che le gestanti sono frequentemente supplementate con folati sin dall'inizio della gravidanza (per la prevenzione dei difetti del tubo neurale) e ciò impedisce di svelare un'eventuale iperomocisteinemia (5). Perciò, nei paragrafi seguenti si analizzeranno i dati più interessanti relativi alle relazioni tra iperomocisteinemia, folati e patologia vascolare nella popolazione generale.

IPEROMOCISTEINEMIA E PATOLOGIA VASCOLARE

I primi studi che hanno proposto la possibile associazione tra omocisteina e patologia vascolare risalgono alla fine degli anni 60, con le evidenze della grave e precoce malattia aterosclerotica che colpiva i pazienti affetti da una rara malattia metabolica, l'omocistinuria (6). Questa condizione, dovuta nella maggioranza dei casi alla carenza omozigote dell'enzima che catalizza la transulfurazione dell'omocisteina a cisteina, la cistationina- β -sintetasi (CBS), si manifesta con una grave iperomocisteinemia ($> 100 \mu\text{mol/L}$) ed una serie di anomalie scheletriche, oculari e neuropsichiche. Il dato fu ancora più evidente quando fu pubblicata la prima sorveglianza a lungo termine di un'ampia coorte di pazienti omocistinurici, che sottolineò il rischio di patologia trombotica arteriosa e venosa giovanile di questi pazienti (7). Nei due decenni successivi si sono moltiplicate le segnalazioni che hanno messo in relazione anche una iperomocisteinemia lieve ($15-30 \mu\text{mol/L}$)–moderata ($30-100 \mu\text{mol/L}$) con il rischio di patologia vascolare. Livelli plasmatici elevati di omocisteina prima e/o dopo un carico orale di metionina sono stati descritti, infatti, sia in pazienti con malattia aterosclerotica (coronaropatia, malattia cerebrovascolare e arteriopatia periferica) (8), che patologia tromboembolica venosa (9), ottenendo evidenze epidemiologiche e cliniche convincenti. Alcuni autori sono giunti a stimare che l'iperomocisteinemia contribuisca per almeno il 10% al rischio trombotico della popolazione generale (10), con possibile sinergismo in associazione ad altri fattori di rischio, come il fumo di sigaretta e l'ipertensione arteriosa (11). Ciò ha destato grande interesse per questa anomalia metabolica che, a differenza della rarissima forma grave, ha un impatto molto notevole nella popolazione generale, riscontrandosi in circa il 5-10% dei soggetti, così come piuttosto comuni sono alcune cause sia acquisite (deficit di vitamine del gruppo B) che genetiche di iperomocisteinemia moderata (3). Tra queste ultime, infatti, l'eterozigosi per il deficit di CBS si riscontra in circa lo 0.5% della popolazione generale (7); l'eterozigosi per la mutazione della CBS 844ins68, recentemente individuata (12), è presente nel 10-15%; la mutazione C677T della 5,10-metilentetraidrofolato-reduttasi (MTHFR), associata a forma termolabile dell'enzima, con attività ridotta all'incirca del 50% (13,14) si rileva in omozigosi con prevalenza variabile dal 5 al 20% nelle popolazioni caucasiche esaminate (13-16). La presenza di più anomalie genetiche, inoltre, o la concomitanza di fattori acquisiti, in particolare nutrizionali, interagiscono nel determina-

Tabella I: Cause di iperomocisteinemia (HHcy)

Alterazioni genetiche

Deficit di cistationina- β -sintetasi (CBS)

omozigote (1/335.000 nati): HHcy grave, 90-95% dei casi di omocistinuria
eterozigote (0.5% popolazione generale): HHcy lieve-moderata

eterozigote 844ins68 (10-15% popolazione generale) in genere non associata a HHcy, se non coesistono altre alterazioni genetiche o acquisite

Deficit di 5,10-metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR)

omozigote (1/3.350.000): HHcy grave, 5-10% dei casi di omocistinuria
eterozigote ($< 0.5\%$ popolazione generale): HHcy lieve-moderata

omozigote C677T: variante enzimatica termolabile (50% attività) (5-20% pop. gen.); HHcy lieve-moderata nel 30-60% dei casi.

Altre anomalie enzimatiche rare:

metionina sintetasi
betaina-omocisteina metiltransferasi

Anomalie acquisite

Deficit vitaminici (folati, vitamina B12):

la causa più frequente, specie nell'anziano.

Insufficienza renale cronica e trapianto renale

Farmaci interferenti con il metabolismo delle vitamine

Folati	metotrexate, anticonvulsivanti
Vitamina B ₁₂	nitriti
Vitamina B ₆	teofillina

Psoriasi

Leucemie acute

Patologie tiroidee

re iperomocisteinemia e, secondo alcuni studi, il rischio cardiovascolare (16). Le più comuni cause genetiche ed acquisite di iperomocisteinemia sono indicate nella Tabella I. Se i dati degli studi retrospettivi caso-controllo e cross-sectionali e delle metanalisi di queste osservazioni fornivano evidenze piuttosto univoche, andando a stimare 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 (pur sottolineando alcune limitazioni legate all'eterogeneità delle popolazioni di pazienti e di controlli utilizzate e degli end-points studiati, alle differenti definizioni di iperomocisteinemia stessa e al possibile ruolo confondente di altri fattori di rischio) (8-11), da ampi studi osservazionali condotti non emergevano successivamente altrettanto conferme. Una recente analisi di sette studi prospettici ha evidenziato che si trovava nessuna associazione o una relazione appena significativa tra livelli di omocisteina e patologie vascolari (1), come si evince anche dalla Tabella II, che riporta alcuni tra i principali studi prospettici disponibili. I detrattori del ruolo dell'omocisteina sottolineano inoltre come non esistano prove definitive anche dei possibili meccanismi patogenetici del danno vascolare legato all'iperomocisteinemia, essendo la maggioranza dei dati ottenuti in studi in vitro ed in presenza di concentrazioni di omocisteina molto lontane da quelle rilevabili anche nei pazienti con

Tabella II: Principali studi prospettici su omocisteina e patologia aterotrombotica

Studio Autore, anno	Popolazione, end-point principali	Associazione OR (95% CI)	p
Physician s Health Study Stampfer, 1992 (34)	14916 uomini, 40-84 aa IMA, morte coronarica	SI 3.4 (1.3-8.8)	<.001
North Karelia Study Alfthan, 1994 (35)	7424 uomini e donne, 40-64 aa IMA, ictus ischemico	NO n. d.	>.05
Physician s Health Study Verhoef, 1994 (36)	14916 uomini, 40-84 aa ictus ischemico	NO 1.2 (0.7-2.0)	.12
Tromso Study Arnesen, 1995 (37)	21826 uomini, 12-61 aa cardiopatía ischemica	SI 1.32 (1.1-1.7)	.002
British Regional Heart Study Perry, 1995 (38)	5561 uomini, 40-59 aa ictus ischemico	SI n.d.	.004
MRFIT Evans, 1997 (39)	12866 uomini, 35-57 aa IMA o morte coronarica	NO 0.82 (0.5-1.5)	>.05
ARIC Folsom, 1998 (40)	15792 uomini e donne, 45-64 aa cardiopatía ischemica	NO 1.4 (0.8-2.3)	.013
Carephilly Study Ubbink, 1998 (41)	2290 uomini, 50-64 aa cardiopatía ischemica	NO 1.28 (0.5-3.2)*	>.05
Rotterdam Study Bots, 1999 (42)	7893 uomini e donne, >55 aa IMA, ictus ischemico	SI 2.5 (1.2-5.4)	<.05
Framingham Study Bostom, 1999 (43)	1947 uomini e donne, >60 aa ictus ischemico	SI 1.82 (1.1-2.9)*	<.001
Hoorn Study Hoogeveen, 2000 (44)	2484 uomini e donne, 50-75 aa mortalita' totale	SI 1.56 (1.1-2.3)	<.05

OR: Odds Ratio; CI: intervallo di confidenza; IMA: infarto miocardico acuto; n.d.: non disponibile; aa: anni; *rischio relativo, P: significatività

le forme più gravi di iperomocisteinemia (17). Di recente, però, proprio da studi nei pazienti omocistinurici sono venute interessanti indicazioni circa la presenza di una condizione di stress ossidativo, espresso da un'umentata escrezione urinaria di isoprostani, correlata ad un'attivazione piastrinica in vivo (valutata dall'escrezione di metaboliti del trombossano), e significativamente ridotta dalla somministrazione di vitamina E (18). Questi dati danno nuovo sostegno all'ipotesi dello stress ossidativo legato alla produzione di radicali liberi dell'ossigeno in seguito ad 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 (Figura 1) (17-19).

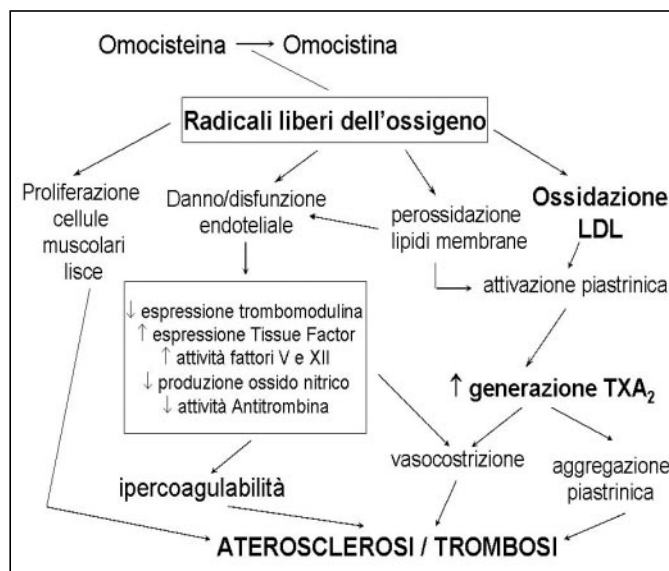
IPEROMOCISTEINEMIA E FOLATI

I folati svolgono un ruolo chiave nel metabolismo dell'omocisteina, fungendo da donatore di gruppi metilici per la rimetilazione a metionina, catalizzata dall'enzima metionina sintetasi, che ha come cofattore la vitamina B12 (Figura 2). Numerosi studi hanno evidenziato una netta correlazione inversa tra livelli plasmatici di omocisteina e folati (3, 4, 16, 20), tanto che il riscontro di iperomocisteinemia va considerato in prima istanza un verosimile marcatore di un carente apporto o assorbimento di tale vitamina. Ciò è particolarmente evidente nei soggetti anziani, in cui carenze subcliniche di folati sono molto frequenti, sia per inadeguato apporto (scarso consumo di vegetali crudi), sia per problemi legati a ridotto assorbimento (malattie infiammatorie

croniche intestinali) o ad interferenze farmacologiche (metotrexate, anticonvulsivanti). I folati rappresentano, quindi, il principale determinante "acquisito" dei livelli di omocisteina, e ciò è ancora più evidente nei soggetti omozigoti per la mutazione MTHFR C677T, che per la ridotta funzione enzimatica, presentano un maggiore fabbisogno di folati perché la via della rimetilazione funzioni efficacemente (16, 20, 21). La stretta correlazione metabolica tra folati ed omocisteina ha indotto anche ad ipotizzare che siano i ridotti livelli di folati il vero fattore di rischio vascolare e che l'iperomocisteinemia rappresenti soltanto un indice biochimico di tale carenza. In questa direzione, in uno studio recente in pazienti con tromboembolismo venoso i

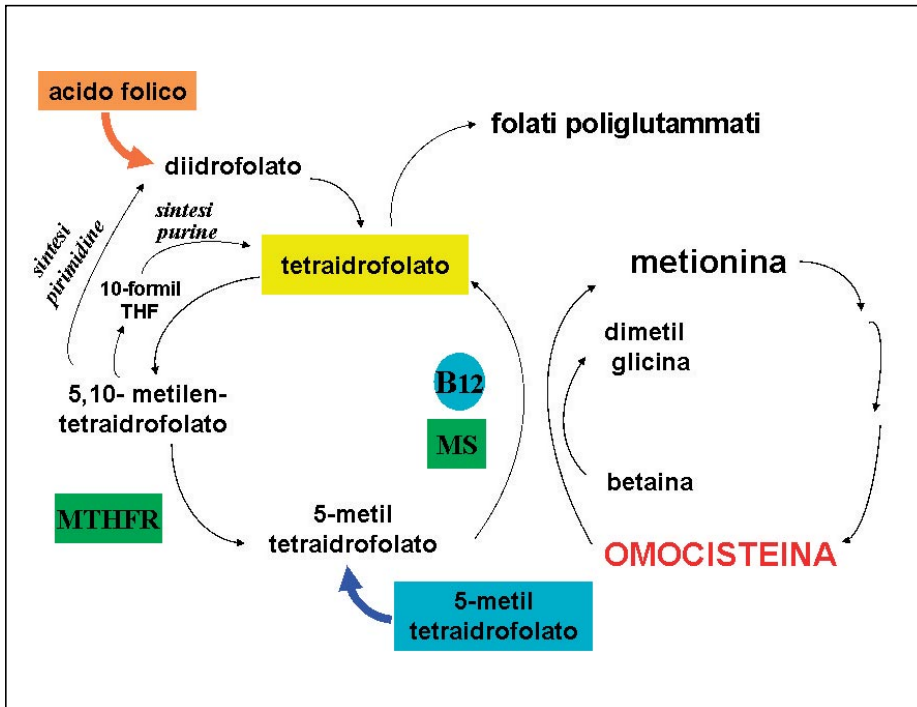
livelli eritrocitari di metilfolato sono risultati importanti predittori di rischio (22). Per la stretta relazione metabolica, appare chiaro come la somministrazione di folati, sia ottenuta incrementandone l'apporto dietetico che attraverso supplementi farmacologici, sia in grado di ridurre significativamente i livelli plasmatici di omocisteina. Sono pertanto in corso numerosi trials (e tra questi può essere inclusa anche la fortificazione dei cereali negli USA) con supplementazione di folati (da soli o in associazione ad altre vita-

Figura 1: Meccanismi patogenetici dell'aterotrombosi correlati allo stress ossidativo e iperomocisteinemia



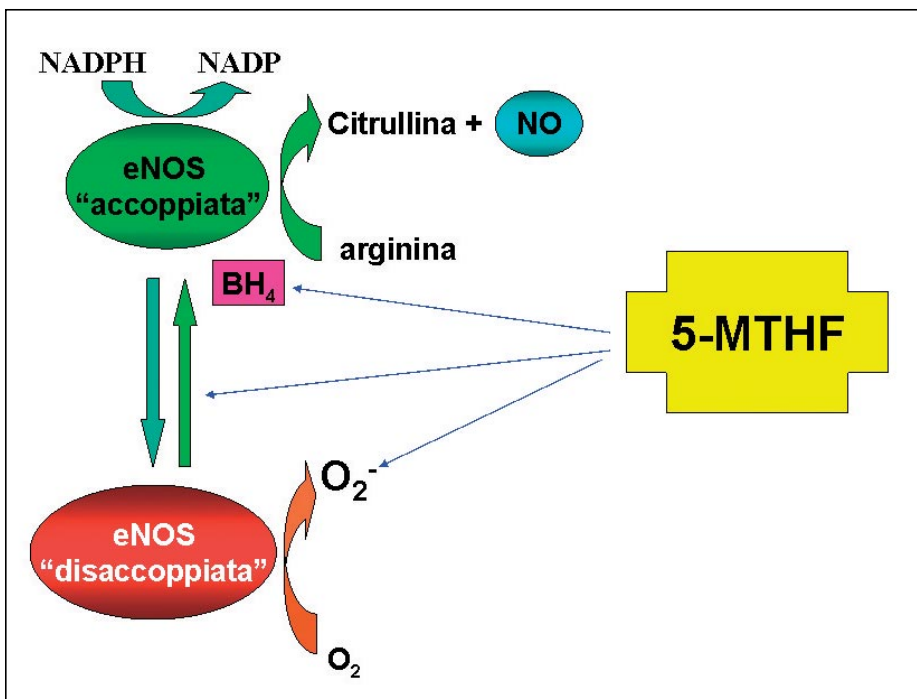
LDL: Low Density Lipoprotein; TXA₂ Trombossano A₂

Figura 2: Metabolismo intracellulare dei folati e inserimento dei supplementi di acido folico e 5-metiltetraidrofolato.



MTHFR: 5,10 metilentetraidrofolato reductasi; MS: metionina sintetasi; THF: tetraidrofolato

Figura 3: Meccanismi potenziali degli effetti benefici dei folati sulla ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS).



NADPH: NAD fosfato ridotto; NADP: NAD fosfato; NO: ossido nitrico; BH4: tetraidrobiopterina; 5-MTHF: 5-metiltetraidrofolato. Da Verhaar et al, (28), modificato

mine del gruppo B) per verificare se la conseguente riduzione dei livelli di omocisteina si associ ad una significativa riduzione degli eventi vascolari (23).

Gli effetti benefici della somministrazione di folati sul metabolismo dell'omocisteina sono noti sin dai primi anni '80, partendo dalle osservazioni in una delle condizioni di iperomocisteinemia di più difficile trattamento, l'insufficienza renale (4), e sono da attribuirsi essenzialmente all'aumentata disponibilità di 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) il donatore di metile nella rimetilazione dell'omocisteina a metionina. Gli studi nell'arco di questi due decenni hanno permesso di definire che la somministrazione di folati riduce i livelli di omocisteina in maniera direttamente proporzionale ai suoi livelli pre-trattamento ed inversamente proporzionale ai livelli di folati pre-trattamento, anche in soggetti con normali livelli di omocisteina e folati (4, 16, 23, 24). Si è evidenziata, ancora, una genotipo-dipendenza di tale effetto: come i soggetti portatori dell'omozigosi MTHFR C677T sono più suscettibili alla carenza di folati, così essi risentono di un effetto significativamente maggiore dopo supplementazione rispetto agli eterozigoti o omozigoti wild-type (25, 26). Il supplemento più utilizzato è rappresentato dall'acido folico e le dosi somministrate variano da <1 mg fino a >20 mg, con riduzioni medie dell'omocisteina plasmatica riportate fino al 57% (in media intorno al 25%) e spesso non chiaramente correlabili alla dose di folato somministrata (23, 24). Una recente metanalisi evidenzia che anche le dosi più basse di acido folico (<1 mg) sono sufficienti ad ottenere una riduzione dei livelli di omocisteina proporzionalmente equivalente a quella rilevata con dosi più elevate (24). Il confronto dei vari studi è, però, spesso difficile, essendo estremamente eterogenei i protocolli di trattamento (oltre alle dosi, durata e associazione di altre vitamine del gruppo B) e le popolazioni studiate (livelli pre-trattamento di omocisteina e folati, genotipo). Le analisi dei trials clinici, inoltre, non permettono, al momento, di identificare una dose minima di acido folico al

di sotto della quale non si rilevano benefici significativi sui livelli di omocisteina. Il problema non è trascurabile, considerando che i programmi di prevenzione cardiovascolare prevedono la somministrazione cronica a lungo termine di tali vitamine e che ci sono popolazioni che assumono da tempo alimenti fortificati. E' noto che il 5-MTHF rappresenta la forma del folato prevalente in natura e biologicamente attiva, veicolata nel sangue e depositata nei tessuti sotto forma di poliglutammati. L'acido folico, forma sintetica comunemente utilizzata nei supplementi e nella fortificazione degli alimenti, viene reso metabolicamente attivo mediante conversione enzimatica a 5-MTHF (riduzione a diidrofolato e tetraidrofolato e successiva metilazione) a livello delle cellule intestinali ed epatiche, ma anche a dosi molto basse (0,4 mg) quote significative di acido folico non metabolizzato sono riscontrabili nel plasma (27). L'esposizione cronica delle cellule a questa forma non naturale di folato, è attualmente oggetto di accurati studi, in particolare negli USA alla luce della fortificazione degli alimenti. La disponibilità di supplementi a base di 5-MTHF, accanto alla somministrazione di una forma naturale di folato, offre il vantaggio di una biodisponibilità maggiore e meno soggetta a variabilità interindividuale rispetto all'acido folico, e supera il problema del mascheramento di una carenza sub-clinica di vitamina B12, possibile con l'acido folico che, essendo metabolizzato direttamente da diidrofolato a tetraidrofolato, "by-passa" la tappa di conversione del 5-MTHF a tetraidrofolato che richiede vitamina B12 (Figura 2). Ciò permette di mantenere, almeno in parte, efficiente la sintesi di nucleotidi e di ridurre gli effetti ematologici della carenza di vitamina B12, ma non quelli neurologici, peraltro non reversibili. Questo problema è particolarmente rilevante nella popolazione anziana, in cui carenze sub-cliniche di folati e vitamina B12, come già ricordato, sono molto frequenti per alterazioni del comportamento alimentare, dell'assorbimento o per interferenze farmacologiche.

Negli ultimi anni i trials clinici hanno dimostrato un'efficacia della somministrazione di 5-MTHF almeno paragonabile all'acido folico nel ridurre i livelli di omocisteina plasmatici, ponendo, inoltre, in luce un effetto persistente ben oltre la sospensione della supplementazione, fino anche, secondo alcuni Autori, a 6 mesi ed indipendente dalla dose somministrata (0,4-15 mg) (16, 26). Ciò è compatibile con una tesaurizzazione del folato in forma di poliglutammati nelle cellule, in particolare nei globuli rossi, come era stato già dimostrato da alcuni studi negli anni '80. E', inoltre, sempre più evidente che l'impatto della somministrazione dei folati nei pazienti con patologia cardiovascolare non si esaurisca con la riduzione dell'omocisteinemia, ma coinvolga effetti più ampi, responsabili di un miglioramento della funzione endoteliale e dello stress ossidativo in genere (28). La somministrazione di folati, infatti, si è dimostrata in grado di prevenire la riduzione della vasodilatazione flusso-mediata che si registra nei soggetti sottoposti a carico di metionina, ben prima ed indipendentemente, dunque, di indurre la riduzione dei livelli plasmatici di omocisteina (29, 30). Dati analoghi sono stati ottenuti in condizioni di

normo-omocisteinemia come nell'iperlipidemia post-prandiale o in pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare (28, 31). In soggetti con cardiopatia ischemica asintomatica si è riportato un miglioramento significativo delle anomalie elettrocardiografiche durante test ergometrico (28). I meccanismi responsabili di tale effetti benefici, solo in parte esplorati, comprendono effetti antiossidanti diretti del 5-MTHF e, in particolare, un'interazione con l'enzima endoteliale ossido nitrico sintetasi (eNOS). Oltre ad una stabilizzazione ed incremento della disponibilità del cofattore tetraidrobiopterina, il 5-MTHF permette la stabilizzazione della eNOS nello stato cosiddetto di "accoppiamento", in cui la produzione di ossido nitrico è associata alla ossidazione di NADPH, evitando lo switch allo stato di "disaccoppiamento" in cui viene invece generato superossido (Figura 3) (28). Il 5-MTHF favorisce, dunque, la produzione di ossido nitrico, che ha effetto vasodilatatore e antiaggregante piastrinico, e riduce quella di superossido, con le conseguenze correlate allo stress ossidativo. E' interessante sottolineare che questi effetti sono stati segnalati sia in presenza dell'isomero naturale L che di quello D del 5-MTHF, a conferma dell'attività biologica anche dell'isomero non naturale, come già valutato per altri composti analoghi (32). In questa direzione si collocano anche recenti dati ottenuti dal nostro gruppo in pazienti con eventi trombotici giovanili e portatori di omozigosi MTHFR C677T, in cui la somministrazione di 15 mg di D-L 5 MTHF ha determinato una significativa riduzione dell'escrezione urinaria dell'isoprostano 8-iso-PGF2a, metabolita dell'acido arachidonico derivante dalla perossidazione non enzimatica dei lipidi di membrana e delle lipoproteine ad opera dei radicali liberi dell'ossigeno e, pertanto, marcatore di stress ossidativo in vivo (33).

CONCLUSIONI

In conclusione, indipendentemente dalle perplessità sul ruolo dell'iperomocisteinemia quale fattore patogenetico diretto o marcatore biochimico di un'anomalia metabolica più complessa, è ampiamente dimostrato che la somministrazione di folati è in grado di correggere questa alterazione, con potenziali effetti benefici più ampi e, verosimilmente non ancora del tutto esplorati, sul sistema cardiovascolare. Il reale impatto nella prevenzione primaria e secondaria di questi interventi sarà più chiaro alla luce degli studi prospettici in corso.

BIBLIOGRAFIA

1. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, et al. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999; 131:363-75
2. Christen WG, Ajani UA, Glynn RJ, et al. Blood levels of homocysteine and increased risks of cardiovascular disease: causal or casual? *Arch Intern Med* 2000; 160:422-34.
3. Kluijtmans LA, Young IS, Boreham CA, et al. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood*. 2003; 101:2483-8.
4. Brattström L. Vitamins as homocysteine lowering agents. *J Nutr* 1996; 126:1276S-80S.
5. Grandone E, Guiotto G, Cerbone AM, et al. Linee guida sull'uso dei farmaci anticoagulanti ed antiaggreganti in gravidanza. *Haematologica* 2003; 88(S1):1-19.
6. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56:111-28.
7. Mudd, SH, Skovby F, Levy HL, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine- β -synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37:1-31.
8. 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.
9. den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998; 80:874-7.
10. Motulsky A. Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects and folic acid. *Am J Hum Genet* 1996; 58:17-20.
11. 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.
12. Sebastio G, Sperandio MT, Panico M, et al. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine- β -synthase deficiency in Italian families and report of four novel mutations. *Am J Hum Genet* 1995; 56:1324-33.
13. 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.
14. de Franchis R, Mancini FB, D'Angelo A, et al. Elevated total plasma homocysteine and 677C->T mutation of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene in thrombotic vascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 59:262-4.
15. D'Angelo A, Coppola A, Madonna B, 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.
16. 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.
17. Coppola A, Davi G, De Stefano V, et al. Homocysteine, coagulation, platelet function and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:243-54.
18. Davi G, Di Minno G, Coppola A, et al. Oxidative stress and platelet activation in homozygous homocystinuria. *Circulation* 2001; 104:1124-8.
19. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998; 338:1042-50.
20. Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, et al. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 1996; 98:2174-83.
21. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*, 1996; 93:7-9.
22. Quere I, Perenger TV, Zittoun J, et al. Red blood cell methylfolate and plasma homocysteine as risk factors for venous thromboembolism: a matched case-control study. *Lancet* 2002; 359:747-52.
23. Clarke R, Armitage J. Vitamin supplements and cardiovascular risk review of the randomized trials of homocysteine-lowering vitamin supplements. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:341-8.
24. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 1998; 316:894-8.
25. Malinow MR, Nieto FJ, Kruger WD, et al. The effects of folic acid supplementation on plasma homocysteine are modulated by multivitamin use and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1157-62.
26. Litynski P, Loehrer F, Linder L, et al. Effect of low doses of 5-methyltetrahydrofolate and folic acid on plasma homocysteine in healthy subjects with or without the 677C->T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase. *Eur J Clin Invest* 2002; 32:662-8.
27. Kelly P, Mc Parlin J, Goggins M, et al. Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:1790-5.
28. Verhaar MC, Stroes E, Rabelink TJ. Folate and cardiovascular disease. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2002; 22:6-13.
29. Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, et al. Endothelial dysfunction by acute hyperhomocyst(e)inemia: restoration by folic acid. *Clin Sci* 1999; 96:235-9.

30. Stroes ESG, van Faassen EE, Yo M, et al. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxid synthase. *Circ Res* 2000; 86: 1129-34.
31. Verhaar MC, Wever RMF, Kastelein JJJ, et al. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, improves endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998; 97:237-41.
32. Baggott JE, Tamura T, Baker H. Re-evaluation of the metabolism of oral doses of racemic carbon isomers of formyltetrahydrofolate in human subjects. *Br J Nutr* 2001; 85:653-7.
33. Coppola A, Mazzola G, 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.
34. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992; 268:877-81.
35. Alfthan G, Pekkanen J, Jaubianen M, et al. Relation of serum homocysteine and lipoprotein(a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study. *Atherosclerosis* 1994; 106:9-19.
36. Verhoef P, Hennekens CH, Malinow MR, et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25:1924-30.
37. Arnesen E, Refsum H, Bonaa KH, et al. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995; 24:704-9.
38. Perry IJ, Refsum H, Morris RW, et al. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995; 346:1395-8.
39. Evans RW, Shaten BJ, Hempel JD, et al. Homocyst(e)ine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1947-53.
40. Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, et al. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 1998; 158:862-7.
41. Ubbink JB, Fehily AM, Pickering J, et al. Homocysteine and ischaemic heart disease in the Caerphilly cohort. *Atherosclerosis* 1998; 140:349-56.
42. Bots ML, Launer LJ, Lindemans J, et al. Homocysteine and short-term risk of myocardial infarction and stroke in the elderly: the Rotterdam Study. *Arch Intern Med* 1999; 159:38-44.
43. Bostom AG, Rosenberg IH, Silbershatz H, et al. Nonfasting plasma total homocysteine levels and stroke incidence in elderly persons: the Framingham Study. *Ann Intern Med* 1999; 131:352-5.
44. Hoogeveen EK, Kostense PJ, Jakobs C, et al. Hyperhomocysteinemia increases risk of death, especially in type 2 diabetes: 5-year follow-up of the Hoorn Study. *Circulation* 2000; 101:1506-11.