

L'USO FARMACOLOGICO DEI FOLATI: PROSPETTIVE ATTUALI.

Antonio Coppola, Giovanni Di Minno

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

Indirizzo per corrispondenza: dott. Antonio Coppola

Centro di Coordinamento Regionale per le Emocoagulopatie

Dipartimento 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

Folate effects for prevention and treatment of megaloblastic anemia are known since 1931, well before this vitamin had been isolated from the leaves of spinach. In the 80's, it was shown that folate have a lowering effect on plasma homocysteine levels and exert a protective role on cardiovascular disease and neural tube defects (NTD). The results on studies conducted on prevention of NTD were so encouraging that fortification of grains by folic acid was adopted as a prevention in the general population in several countries. Although, its role in cardiovascular prevention will be clarified by the ongoing prospective trials of folate and B vitamin supplementation; growing data show protective effects of folate beyond their effect on lowering homocysteine levels, by improving oxidative stress and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity. These effects should be achieved by folate doses higher than those employed to reduce homocysteine levels. Another promising preventive use of folate concerns neuropsychiatric disease and cancer. A simple, well-tolerated and low-cost intervention is becoming a key strategy for prevention of the most important causes of death and morbidity in Western Countries.

Key words: *homocysteine, folate, megaloblastic anemia, cardiovascular prevention*

RIASSUNTO

L'effetto dei folati nella prevenzione e nel trattamento dell'anemia megaloblastica da carenze nutrizionali è noto sin dagli anni '30, ancor prima che la vitamina fosse isolata dalle foglie di spinaci. Questa è stata la precipua indicazione per l'utilizzo dei folati fino agli anni '80, quando si sono ottenute evidenze cliniche circa il loro ruolo protettivo, legato al controllo dei livelli di omocisteina, nei confronti delle malattie cardiovascolari e dei difetti del tubo neurale. Seppure i benefici nella prevenzione cardiovascolare saranno chiari solo alla luce di studi prospettici in corso è evidente il ruolo protettivo dei folati, al di là del controllo dell'iperomocisteinemia, legato nel migliorare la disfunzione endoteliale, in particolare lo stress ossidativo, e la funzione dell'en-

zima ossido nitrico sintetasi (eNOS). Ciò sembra possibile con dosi più elevate di folato rispetto a quelle necessarie per ridurre i livelli di omocisteina, suggerendo un ruolo particolare per supplementi a base di 5-metiltetraidrofolato, la forma di folato che può agire direttamente sulla eNOS, e che a differenza dell'acido folico non espone al possibile mascheramento di carenze latenti di vitamina B₁₂. Altri ambiti per i quali si prevedono interessanti sviluppi nell'utilizzo dei folati sono le malattie neuropsichiatriche e le neoplasie. Il semplice intervento con una vitamina ben tollerata e di basso costo sta diventando una strategia di grande importanza contro le principali cause di mortalità e di morbilità nel mondo Occidentale.

Parole chiave: *omocisteina, folati, anemia macrocitica, prevenzione cardiovascolare.*

CENNI STORICI

All'inizio degli anni '30 la dottoressa Lucy Willis, trasferitasi da Londra in India, si occupò dell'anemia macrocitica in gravidanza (frequente nelle lavoratrici delle manifatture tessili) (1). Poiché erano coinvolte persone economicamente disagiate, la Willis ritenne che la causa dell'affezione fosse la carenza di qualche fattore nutrizionale. Attraverso studi sui ratti albini, ella scoprì che il lievito o un suo estratto, la Marmite, avevano un'attività antianemica che venne confermata nelle pazienti gravide di Bombay (1, 2). Era così stata individuata la importante attività farmacologica dell'acido folico, prima ancora che questo fosse scoperto e descritto. Infatti, solo nel 1941 l'acido folico ricevette il suo nome, quando fu isolato dalle foglie di spinaci (in latino *folium* = foglia) da Mitchell, che ne dimostrò l'attività come fattore di crescita per lo *Streptococcus lactis* (3). In seguito il composto venne descritto nella sua struttura molecolare e sintetizzato in forma cristallina pura nel 1943 da Stokstad nei laboratori Lederle (American Cyanid Company) (4). Anche la Willis, nel frattempo tornata a Londra, sostituì il lievito con il nuovo composto vitaminico puro nel trattamento dell'anemia megaloblastica. Stokstad, lasciata l'Industria e stabilito all'Università di Berkeley, fu il primo, con i suoi colleghi, a isolare, purificare e caratterizzare molti enzimi dei mam-

miferi coinvolti nel metabolismo dei folati (5).

Folato è il termine generico per indicare una serie di composti, strutturalmente correlati con l'acido pteroilglutamico o acido folico, che nel complesso costituiscono un principio vitaminico. Nell'ambito delle reazioni attive nel ciclo dei folati si realizzano: i trasferimenti delle unità monocarboniose per la sintesi dell'anello purinico e la produzione di deossitimidilato, tappa limitante della sintesi del DNA, la trasformazione di serina in glicina; la formazione di glutamato da un metabolita dell'istidina; e la metilazione dell'omocisteina a metionina ad opera dell'importante cofattore 5-metiltetraidrofolato. Quest'ultima reazione smaltisce l'omocisteina, potenzialmente citotossica e, nel contempo, produce metionina che, attivata a S-adenosil-metionina, genera il più importante donatore di metili del metabolismo cellulare (6, 7).

USO FARMACOLOGICO DEI FOLATI.

Da quando è stato disponibile il prodotto sintetico, l'acido folico è stato impiegato per decenni quasi esclusivamente in ambito ematologico. La diagnosi di carenza di folato veniva posta in presenza di anemia macrocitica e di significative anomalie megaloblastiche nel sangue periferico e nel midollo osseo. Alla individuazione di queste classiche caratteristiche ematologiche seguiva la determinazione della concentrazione di folato nel sangue. A partire dagli anni '80 sono entrati in uso sensibili indicatori biochimici di carenza di folato, come la determinazione del metabolita omocisteina che si accumula nel sangue in caso di deficienza della vitamina.

Attualmente vi sono sufficienti prove che la carenza di folato, definita in termini biochimici come incapacità funzionale di controllare l'omocisteina, è correlata ad un aumento significativo del rischio di morbilità non associata all'anemia. L'evidenza più convincente è 1) una predisposizione per la malattia vascolare occlusiva associata all'iperomocisteinemia (8) e 2) un aumento del rischio di sviluppo di malformazioni quali la spina bifida e l'anencefalia, in bambini nati da donne che hanno avuto un insufficiente apporto nutrizionale di folato durante la gravidanza (9, 10). Inoltre, altre potenziali manifestazioni da carenza di folato sono disturbi neuropsichiatrici (11) (come la depressione, le neuropatie periferiche, la degenerazione subacuta combinata del midollo spinale, la demenza di Alzheimer e la malattia di Parkinson); e lo sviluppo di alcuni tipi di neoplasie e la comparsa di alterazioni preneoplastiche a carico degli epitelii gastrointestinali, cervicale e polmonare (12).

Da quanto su esposto si deduce che la carenza di folato, un tempo considerata solo causa di disturbo ematologico, è ora riconosciuta come una disfunzione multisistemica (13).

L'evento più eclatante della ricerca sui folati è la dimostrazione che la somministrazione periconcezionale di acido folico permette di realizzare prevenzione primaria (15) e secondaria (14) sui difetti di chiusura del tubo neurale. I dati sono talmente convincenti, in relazione a una patologia così devastante, che le autorità politico-sanitarie di varie nazioni tra cui Stati Uniti e Canada, hanno deciso di intervenire sulla popolazione generale, imponendo l'integrazione delle farine

cereali con un livello di acido folico compreso tra 0,095 e 0,308 mg/100g (16). Questa decisione, adottata dopo 10 anni di discussione, si propone di ridurre l'incidenza dei difetti del tubo neurale, che negli Stati Uniti è di 2500 casi all'anno, e coinvolge circa 48 milioni di donne in età fertile. Tuttavia, sulla decisione ha influito pesantemente la considerazione di altri potenziali benefici ottenibili anche sulle restanti donne e sugli oltre 144 milioni di uomini, in termini di riduzione del rischio di malattie vascolari ostruttive e di carcinogenesi, in particolare a livello del colon-retto (17). Ulteriori benefici riguardano la possibilità di ridurre le alterazioni cerebrali organiche, come demenza di Alzheimer e malattia di Parkinson e la prevenzione dei disturbi depressivi (11).

Ancora oggi si discute tra gli esperti (18-20) se i dati sulla prevenzione dei danni vascolari con folati siano sufficienti per consigliare l'intervento sulla popolazione generale o, almeno, su pazienti a rischio. Tuttavia, oltre 400 milioni di soggetti sono stati sottoposti a partire dal 1998 a un supplemento di acido folico di circa 100 µg/die, mediante la "fortificazione" delle farine. Nelle popolazioni coinvolte si è ottenuto un aumento dei livelli plasmatici di folato, una riduzione dell'omocisteinemia e, contestualmente, una riduzione dell'incidenza dei difetti del tubo neurale (16, 21). Occorreranno ancora anni per rilevare ulteriori potenziali benefici sulla prevenzione dei danni vascolari e la riduzione di alcuni tipi di neoplasia. Ma già è disponibile una prima segnalazione sulla riduzione del neuroblastoma (22), come conseguenza della integrazione delle farine con acido folico. In questo contesto merita di essere citato un recente studio epidemiologico, coordinato dall'Istituto Mario Negri di Milano, che ha correlato, in un campione reclutato in Italia nelle province di Pordenone, Roma e Latina e nel Cantone svizzero francofono di Vaud, i bassi livelli di apporto di folato con l'incidenza di cancro oro-faringeo (23).

In ambito ostetrico-ginecologico l'uso dei folati si è esteso dalla cura dell'anemia megaloblastica e dalla riduzione dell'incidenza dei difetti del tubo neurale a una serie di altre condizioni (24) quali la prevenzione di altre malformazioni come la palatoschisi, alterazioni cardiologiche e delle vie urinarie, la prevenzione di aborti spontanei, il distacco intempestivo e l'*abruptio* della placenta, i ritardi di crescita intrauterina, la nascita di neonati sotto peso, il parto prematuro, e la preeclampsia.

Per molti di questi disturbi uno dei fattori etiopatogenetici è l'iperomocisteinemia. Questa alterazione metabolica è considerata un nuovo fattore di rischio per la malattia vascolare aterosclerotica, oltre a quelli noti: iperlipidemia, ipertensione, obesità, diabete, abuso di fumo (25). Sono in corso una decina di estesi studi clinici di intervento con acido folico e altre vitamine del gruppo B per provare definitivamente il nesso causale tra carenza di folato, iperomocisteinemia e insorgenza di danni vascolari aterosclerotici e trombotici (8, 26). Nel frattempo è stata individuata come "*end-point*" secondario precoce per le alterazioni vascolari aterosclerotiche la funzione endoteliale (27).

Una funzione endoteliale compromessa è fattore predittivo di danno vascolare e, viceversa, farmaci dotati di azione antiaterosclerotica (statine, calcioantagonisti, ACE-inibitori,

ecc.) favoriscono un miglioramento della funzione endoteliale. A lungo si è ritenuto che l'endotelio vascolare fosse semplicemente una membrana semipermeabile inerte tra sangue e parete vasale, ma ora è considerato un organo endocrino importante, esteso e altamente attivo che è responsabile di numerose funzioni fisiologiche. L'endotelio sintetizza e rilascia un considerevole numero di fattori che sono determinanti per: il mantenimento del tono vascolare, la preservazione della normale permeabilità, l'inibizione della adesione e migrazione leucocitaria, l'attivazione e aggregazione piastrinica, la migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce, l'angiogenesi.

Nella disfunzione endoteliale si altera l'equilibrio tra fattori vasodilatatori, antitrombotici e antiproliferativi (ossido nitrico, prostaciclina, peptide natriuretico di tipo C, fattore iperpolarizzante di origine endoteliale) e fattori vasoconstrictori, protrombotici e proliferativi (endotelina, superossido, angiotensina II, trombossano A₂).

Il fattore di rilassamento endoteliale, identificato nel monossido di azoto o ossido nitrico (NO), è stato riconosciuto come il principale determinante delle proprietà antiaterosclerotiche dell'endotelio. La biosintesi di NO si realizza attraverso l'ossidazione del substrato arginina ad opera dell'isoforma endoteliale dell'enzima "ossido nitrico-sintetasi" (eNOS). Questo enzima svolge la sua fondamentale funzione regolatrice sul tono vascolare solo se è correttamente assemblato nelle sue subunità e in presenza di adeguate concentrazioni del cofattore tetraidrobiopterina (cosiddetto stato di "accoppiamento") (28). Al contrario, in condizioni di stress ossidativo, la struttura dell'enzima si altera e diventa produttore di anione superossido (O₂⁻) che sottrae NO, già deficitario, per produrre perossinitrito altamente citotossico. L'omocisteina in condizioni normali reagisce con il NO formando un nitroso-tiolo dotato di attività vasodilatatrice che prolunga la fugace azione di NO. 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 O₂⁻, accentuando lo stress ossidativo (28).

L'EFFETTO PROTETTIVO DEI FOLATI NELLA PATOLOGIA VASCOLARE.

Il folato, utilizzato nella forma di 5-metiltetraidrofolato a dosi superiori rispetto a quelle sufficienti per ridurre l'iperomocisteinemia, può migliorare la disfunzione endoteliale attraverso vari meccanismi (29-32) in quanto regola i livelli di omocisteina, riduce la produzione di O₂⁻ da parte di eNOS, ripristina la tetraidrobiopterina, stabilizza l'enzima eNOS mediante una specifica azione antiossidante, riporta eNOS alla struttura corretta aumentando la produzione di NO.

E' importante notare che la duplice azione di potenziamento della produzione di NO e di riduzione di O₂⁻ è esercitata da entrambi gli enantiomeri 6R e 6S del metiltetraidrofolato. L'enantiomero non naturale 6R, che un tempo si pensava inerte relativamente all'azione su eNOS, è attivo quanto l'enantiomero naturale 6S (29). Ciò evidenzia che l'attiva-

zione dell'enzima eNOS da parte del metiltetraidrofolato non dipende da un'attività metabolica, ma da una specifica azione antiossidante esplicita mediante la possibilità di aderire all'enzima utilizzando i siti di legame della tetraidrobiopterina, analogo strutturale del folato (33). Recentemente è stata ampiamente descritta l'azione antiossidante del metiltetraidrofolato (34) ed evidenziata anche *in vivo* (35).

Le dosi giornaliere di acido folico sufficienti per normalizzare l'iperomocisteinemia variano da 0,1 a 5 mg. Raramente questi supplementi farmacologici permettono di migliorare anche la disfunzione endoteliale (36). Parte dell'acido folico che viene assunto non viene metabolizzato e si ritrova immutato a livello plasmatico. L'endotelio, pertanto, viene esposto per ore a una rilevante concentrazione di folato ossidato (37). Nella necessità di aumentare le dosi di folato per ottenere, oltre al controllo dell'iperomocisteinemia, anche un miglioramento della funzione endoteliale, si è riconsiderata la cinetica dell'acido folico dopo dosi variabili da 0,4 a 5 mg. Si è così rilevato che, misurando nel plasma l'acido folico immutato, questo aumenta dal 20% per la dose più bassa fino all'80 % per la dose di 5 mg. Inoltre, vi è un'ampia variabilità interindividuale del picco massimo e dell'area sotto la curva concentrazione/tempo (38). In questo contesto, in cui lo stress ossidativo è cruciale per il corretto funzionamento di eNOS, emerge l'opportunità di utilizzare, per migliorare la funzione endoteliale, un supplemento di folato non costituito da acido folico ma da metiltetraidrofolato, che, essendo già in forma ridotta, agisce direttamente sull'enzima eNOS stabilizzandone la struttura, potenziando la produzione di NO e riducendo la liberazione di superossido.

Si prospetta, alla luce di ciò, la possibilità di differenziare l'uso di acido folico da quello di metiltetraidrofolato, riservando il primo per il trattamento preventivo a dosi di 266 - 400 µg (7) che consentono il controllo dei livelli di omocisteina senza superare il limite di 1000 µg che la "Food and Drug Administration" pone come soglia di sicurezza per evitare il mascheramento dei danni derivanti da un'eventuale carenza latente di vitamina B₁₂ (16). Il metiltetraidrofolato, consentendo la somministrazione di dosi farmacologiche di 15-50 mg, che permettono non solo il controllo dell'omocisteina ma anche il miglioramento della funzione endoteliale (39-41), troverebbe impiego elettivo nei soggetti a rischio (prevenzione vascolare secondaria e prevenzione primaria selezionata).

Nel generale fervore di interesse sul folato, recentemente, si sono ripetuti, con tecnologie assai più sofisticate, i lavori sulla permanenza nell'organismo del prodotto marcato e si è confermato, in particolare con la spettrometria di massa accelerata (AMS), strumentazione analitica dotata della eccezionale sensibilità di 10⁻¹⁸ moli, che il tempo di permanenza medio del folato è di 120 giorni (42). In coerenza con questo dato vari ricercatori hanno evidenziato che dopo la sospensione di un trattamento con folato si riscontrano nel sangue elevati livelli della vitamina e si esercita ancora un controllo sull'omocisteina a distanza di 2 o 3 mesi dalla sospensione (35, 43, 44). Ne consegue che per il metiltetraidrofolato potrebbe essere adottata una posologia ciclica

intermittente (45), costituita da un mese di trattamento a 15 mg/d (sono comunque auspicabili studi di "dose-finding"), seguito da 2 o 3 mesi di pausa.

Un semplice intervento con una vitamina, facilmente praticabile, sicuro e di basso costo sociale, può dunque migliorare grandemente lo stato di salute e il benessere della popolazione generale. L'intervento farmacologico con metiltetraidrofolato su pazienti a rischio può evocare effetti terapeutici paragonabili a quelli ottenibili con statine o ACE-inibitori, con maggiore sicurezza e minor costo sociale. Il folato è stato impiegato per decenni per correggere e prevenire l'anemia megaloblastica. Senza minimizzare l'importanza clinica, tuttora valida, di questa indicazione, è rilevante il riconoscimento di potenzialità assai più estese nella prevenzione di malattie che risultano tra le principali cause di morte nei paesi industrializzati, come le malattie vascolari ostruttive e le neoplasie. Altri potenziali benefici potrebbero coinvolgere malattie degenerative gravemente debilitanti come la demenza di Alzheimer e il morbo di Parkinson. La realtà più incoraggiante è la prevenzione dei disturbi del tubo neurale ottenuta sia con il supplemento periconcezionale di acido folico, sia con la fortificazione delle farine. Il folato, quindi,

assume una valenza di rilevanza socio-sanitaria notevole ed è candidato a svolgere un ruolo importante nel mantenimento di un buon stato di salute.

Si è appena svolta a Varsavia la prima conferenza internazionale sui folati: analisi, biodisponibilità e salute, organizzata dalla associazione Folate Func Health supportata dall'Agenzia della Qualità della Vita della Comunità Europea. Questo importante appuntamento si propone di diffondere la consapevolezza dell'importanza dei folati nella dieta, e la ricerca di alternative, oltre alle farine per la "fortificazione", riguardanti le acque minerali e il latte. Si discute, inoltre, l'opportunità di sostituire l'acido folico con il metiltetraidrofolato per evitare i due inconvenienti associati all'uso di acido folico: l'accumulo nel sangue di prodotto immo-dificato ossidato e il mascheramento di una latente carenza di vitamina B₁₂.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori sono grati al dott. Enrico Castino per la preziosa, sempre cortese e proficua, collaborazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Willis L, Mehta MM. Studies in "perniciosa anaemia" of pregnancy, I preliminary report. *Indian Journal of Medical Research* 1930;17:777-15.
2. Willis L. Treatment of "perniciosa anaemia of pregnancy" and "tropical anaemia" with special reference to yeast extract as curative agent. *Br Med J* 1931; 1:1059-63.
3. Mitchell AK, Snell EE, Williams RJ. The concentration of "folic acid". *J Am Chem Soc* 1941;63:2284-7.
4. 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.
5. Stokstad ELR. Early work with folic acid. *Fed Proc* 1979; 38:2696.
6. Wagner C. Biochemical Role of Folate in Cellular Metabolism. In: Bailey LB (ed) *Folate in health and disease*. Marcel Dekker. pp 23-42, 1995.
7. Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Gen Metab* 2000; 71:121-6.
8. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354: 407-15.
9. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, et al. Neural-tube defects. *N Engl J Med* 1999; 241:1509-14.
10. Scott JM, Weir DG, Kirke PN. Folate and neural tube defects. In: Bailey LB (ed) *Folate in health and disease*. Marcel Dekker. pp 329-360, 1995.
11. Bottiglieri T, Crellin RF, Reynolds EH. Folate and neuropsychiatry. In: Bailey LB (ed) *Folate in health and disease*. Marcel Dekker. pp 435-462, 1995.
12. Mason JB. Folate status: effects on carcinogenesis. In: Bailey LB (ed) *Folate in health and disease*. Marcel Dekker. pp 361-378, 1995.
13. Green R, Miller JW. Folate deficiency beyond megaloblastic anemia: hyperhomocysteinemia and other manifestations of dysfunctional folate status. *Seminars in Hematology* 1999; 36:47-51.

14. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991; 338:131-9.
15. Czeizel AF, Dudas J. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992; 327:1832-8.
16. Feinleib M, Beresford SAA, Bowman BA, et al. Folate fortification for the prevention of birth defects: case study. *Am J Epidemiol* 2001; 154 (S60):12-5.
17. Giovannucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia. A review. *J Nutr* 2002; 132: 2350-5.
18. Brattstrom L, Wilcken DEL. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 315-9.
19. Scott JM. Homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 333-7.
20. Ueland PM, Refsum H, Beresford SAA, et al. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:324-8.
21. Persad VL, Van den Hof MC, Dubé JM, et al. Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification. *CMAJ* 2002; 167:241-6.
22. French AE, Grant R, Weitzman S, et al. Folic acid food fortification is associated with a decline in neuroblastoma. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74:288-94.
23. Pelucchi C, Talamini R, Negri E, et al. Folate intake and risk of oral and pharyngeal cancer. *Annals of Oncology* 2003; 14:1677-81.
24. Eskes TKAB. Homocysteine and human reproduction. In: Carmel R, Jacobsen DW (eds) *Homocysteine in health and disease*. Cambridge University Press. pp 451-465, 2001.
25. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1995; 274:1049-52.
26. Clarke R. Design of clinical trials to test the homocysteine hypothesis of vascular disease. In: Carmel R, Jacobsen DW (eds) *Homocysteine in health and disease*. Cambridge University Press. pp 477-484, 2001.
27. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:168-73.
28. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:F193-6.
29. Stroes ESG, van Faassen EE, Yo M, et al. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 2000; 86:1129-34.
30. Verhaar MC, Wever RMF, Kastelein JJP, et al. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 97:237-41.
31. 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.
32. Das UN. Folic acid says No to vascular diseases. *Nutrition* 2003; 19:686-90.
33. Hyndman ME, Verma S, Rosenfeld RJ. Interaction of 5-methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin on endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H2167-72.
34. Reazk BM, Haenen GR, van der Vijgh WJ, Bast A. Tetrahydrofolate and 5-methyltetrahydrofolate are folates with high antioxidant activity. Identification of the antioxidant pharmacophore. *FEBS* 2003; *Lett* 555:601-5.
35. 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):123-7.
36. 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 vasodilation or carotid artery stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:2072-8.
37. Kelly P, McPartlin J, Gaggins M, et al. Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:1790-6.
38. Bailey SW, Malinow MR, Hess DL, et al. Folic acid pharmacokinetics: dose-dependent metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26 (S1):122-5.
39. Cianciolo C, Manna C, Isola E, et al. Effects of 5-MTHF therapy on hyperhomocysteinemia in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:9 (A147)-13.
40. Buccianti G, Raselli S, Baragetti I, et al. 5-methyltetrahydrofolate restores endothelial function in uraemic patients on convective haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:857-61.
41. 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; 49:79-82.
42. Clifford AJ, Lin Y, Dueker SR, et al. The major metabolic pathways of folate, quantified in vivo in humans with an oral tracer dose of ¹⁴C-folic acid. *FASEB* 2003; *J7*, A276.
43. Brouwer IA, van Dusseldorp M, Thomas CMG, et al. Low-dose folic acid supplementation decreases plasma homocysteine concentrations: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:99-103.
44. Santi R, Demicheli M, Contino L, et al. Homocysteine plasma levels after suspension of vitamin treatment. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1330-4.
45. 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.