

ALTERAZIONI DEL METABOLISMO DELL'ACIDO FOLICO

M. Righetti

U.O.C. di Nefrologia e Dialisi, Ospedale di Vimercate, Vimercate (MI)

Folate metabolism dysfunction

This review examines the history of folate, its metabolism and its relationship with drugs and diseases. The scientific interest in folate has been increasing in recent years because of new findings related to its important role in many diseases like macrocytic anemia, congenital malformations, vascular thrombosis, atherosclerotic disease and cancer. The fascinating puzzle of folate is analyzed and the most recent news about folate treatment in patients with chronic renal failure reported. (G Ital Nefrol 2008; 25: 32-41)

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

Cardiovascular disease, Dialysis, Folate, Renal failure

PAROLE CHIAVE:

Acido folico, Dialisi, Insufficienza renale, Malattia cardiovascolare

✉ Indirizzo degli Autori:

Dr. Marco Righetti
U.O.C. di Nefrologia e Dialisi
Ospedale di Vimercate
Via C. Battisti, 23
20059 Vimercate (MI)
e-mail: righettim@hotmail.com

CENNI STORICI

Ottanta anni fa la Dr.ssa Lucy Wills (1), trasferitasi in India dall'Inghilterra, iniziò a studiare le cause dell'anemia macrocitica. Il frequente riscontro di questa patologia nelle donne indigenti in gravidanza la indirizzò verso la ricerca di un deficit di uno o più fattori nutrizionali. Lucy Wills scoprì che la somministrazione di "Marmite", un estratto di lievito utilizzato nella cucina britannica soprattutto come crema salata spalmabile sul pane, migliorava l'anemia macrocitica sia nei ratti, sia nelle pazienti gestanti di Bombay (2). Pertanto, l'utilizzo di questo concentrato naturale di vitamine e proteine ad alto valore nutritivo, permise di svelare una importante attività terapeutica dell'acido folico (AF), ancora prima della sua scoperta.

Infatti, solo nel 1941 l'AF acquisì questo nome dal termine latino "folium", poiché venne isolato da Mitchell (3) dalle foglie di spinaci, originari dell'Asia sud occidentale ed introdotti in Europa già nel XI secolo. Successivamente, nel 1943, l'AF venne descritto nella sua struttura molecolare e sintetizzato in forma cristallina pura da Angier e Stokstad (4) nei laboratori Lederle (American Cyanid Company) a New York. Anche L. Wills, ritornata a Londra nel 1932, sostituì nel 1945 l'estratto di lievito con il nuovo composto vitaminico puro per il trattamento dei pazienti affetti da anemia macrocitica. Bob Stokstad, abbandonata

l'industria e stabilitosi all'Università di Berkeley dal 1963, fu il primo ad isolare, purificare e caratterizzare molti enzimi dei mammiferi coinvolti nel metabolismo dell'AF (5). L'AF sintetico è stato utilizzato per decenni quasi esclusivamente in ambito ematologico. La diagnosi di deficit di AF veniva eseguita in seguito al riscontro di anemia macrocitica e di significative anomalie megaloblastiche nel sangue periferico e nel midollo osseo. Il riscontro di queste alterazioni ematologiche aveva per conseguenza la determinazione della concentrazione ematica di AF. Il ruolo essenziale dei folati (6) nella sintesi del DNA e nella conversione dell'omocisteina a metionina venne scoperto negli anni '50 e '60. In particolare si evidenziò la metilazione della deossiridina monofosfato a deossitimidina monofosfato e la conseguente conversione del 5.10-metilentetraidrofolato (5.10-MTHF) a diidrofolato (DHF). Inoltre, dagli anni '80 sono stati introdotti nuovi indicatori biochimici di deficit di AF, come la concentrazione plasmatica di omocisteina.

CARATTERISTICHE GENERALI

Il termine AF o acido pteroilmonoglutamico (Fig. 1) ed il termine folati sono spesso utilizzati come sinonimi, anche se si preferisce la prima definizione. In verità con il termine "folati" sono considerati tutti i compo-

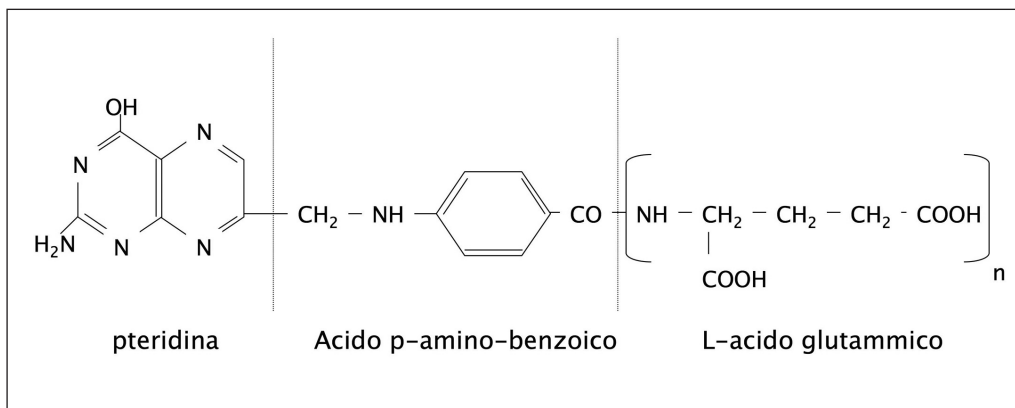
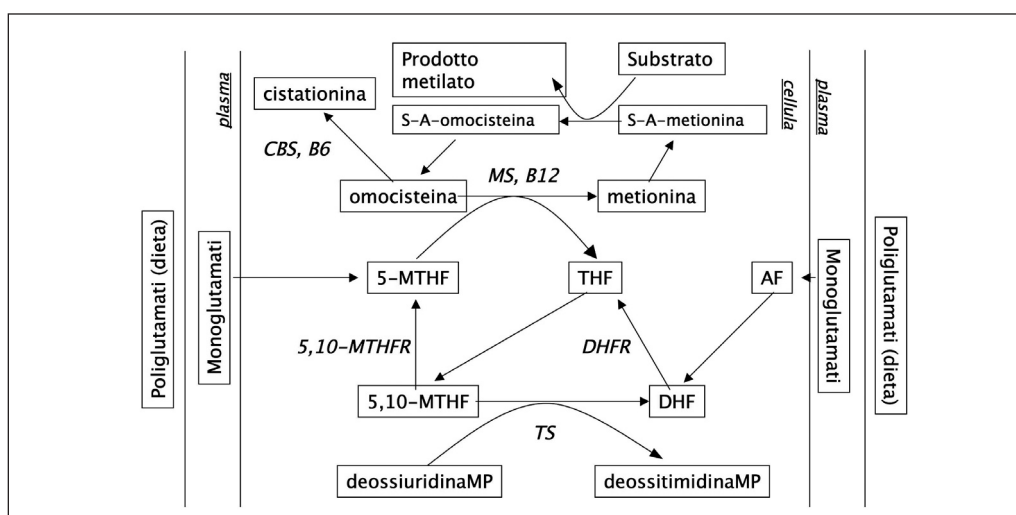


Fig. 1 - Formula chimica dell'acido folico, n = numero di residui di acido glutammico

Fig. 2 - Ciclo cellulare dei folati. AF: acido folico, CBS: cistationina beta sintetasi, DHF: diidrofolato, DHFR: diidrofolato reductasi, MS: metionina sintetasi, 5-MTHF: 5-metil-tetraidrofolato, 5,10-MTHF: 5,10-metilen-tetraidrofolato, 5,10-MTHFR: 5,10-metilen-tetraidrofolato reductasi, THF: tetraidrofolato, S-A-metionina: S-Adenosil-metionina, S-A-omocisteina: S-Adenosil-omocisteina.



sti vitaminici con varie formule chimiche attivi nelle reazioni di trasferimento dell'unità monocarboniosa nel metabolismo degli acidi nucleici e degli aminoacidi. L'AF è la forma più stabile tra i folati e si trova raramente negli alimenti come tale, mentre costituisce sia il composto utilizzato nella fortificazione degli alimenti, sia il composto più frequentemente impiegato nei supplementi vitaminici. I vari vitameri differiscono per il grado di riduzione dell'anello della pteridina nelle posizioni 5-6-7-8, per il tipo di unità monocarboniosa legata nelle posizioni 5 e 10 e per il numero di residui di glutammato. Negli alimenti si possono trovare diversi tipi di folati; la maggior parte sono pteroilpoliglutammati che contengono da 1 a 6 molecole di glutammato e tali vitameri sono variamente distribuiti nei diversi gruppi di alimenti. Le forme più frequenti sono il 5-metil-tetraidrofolato (5-MTHF), il 5-formil-tetraidrofolato ed il tetraidrofolato (THF). Nel ciclo dei folati (Fig. 2) vengono attuate le seguenti principali reazioni:

1) il trasferimento di unità monocarboniose per la sintesi dell'anello purinico e la produzione di deossitimidina, tappa necessaria per la sintesi del DNA;

2) la metilazione dell'omocisteina a metionina ad opera dell'enzima metionina sintetasi con l'utilizzo del substrato 5-MTHF e della vitamina B12 come cofattore.

Quest'ultima reazione riduce i livelli plasmatici di omocisteina, potenzialmente citotossica e, contemporaneamente, produce metionina che, attivata a S-adenosil-metionina, genera il più importante donatore di gruppi metilici del metabolismo cellulare (7). I vegetali a foglia larga (spinaci, broccoli, asparagi, lattuga), la frutta, il latte, le uova, il fegato e il lievito contengono i folati. Anche qualche tipo di batterio intestinale forma i folati. Il fegato è l'organo di maggiore accumulo dei folati che vengono eliminati nella via biliare e successivamente riassorbiti nel digiuno e nell'ileo. Tale circolazione entero-epatica è necessaria per il mantenimento dei livelli plasmatici dei folati. L'alcol interferisce con la circolazione entero-epatica dei folati e può diminuire il valore di folatemia in alcune ore. L'assorbimento intestinale dei folati si verifica nella parte prossimale del digiuno e nell'ileo con un meccanismo non completamente chiarito. Le coniugasi, γ -glutamyl-carbossi-

peptidasi, site sull'orletto a spazzola degli enterociti separano i poliglutammati in monoglutammati permettendo così l'assorbimento del folato che circola nel sangue libero o legato all'albumina come 5-MTHF. Tale vitamero è trasferito all'interno della cellula da un trasportatore specifico per il THF e i suoi derivati. Il 5-MTHF, giunto all'interno della cellula, libera un gruppo metilico per la sintesi di metionina dalla omocisteina trasformandosi in THF, che è riconiugato a 5.10-MTHF per la sintesi di purine e timidilato.

TEST DI VERIFICA

1) Quale alimento è stato inizialmente utilizzato per la terapia dell'anemia macrocitica?

- Uova
- Estratto di lievito
- Spinaci
- Latte
- Mele.

2) Quale è il substrato dell'enzima metionina sintetasi?

- Acido pteroilpoliglutammino
- 5.10-metilentetraidrofolato
- Tetraidrofolato
- 5-metiltetraidrofolato
- Formiltetraidrofolato.

3) La vitamina B12 è il cofattore di quale enzima?

- Metilentetraidrofoloreduktasi
- Diidrofoloreduktasi
- Metionina sintetasi
- Coniugasi
- Cistationina beta sintetasi.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

ACIDO FOLICO E L'ENZIMA 5.10-METILENTE-TRAIIDROFOLATOREDUKTASI

I polimorfismi dell'enzima 5.10-metilentetraidrofoloreduktasi (5.10-MTHFR) sono associati allo sviluppo di malformazioni congenite, anomalie della coagulazione, patologie cardiovascolari e neoplasie. La mutazione "missenso" 677 CT (A222V) causa la sintesi di un enzima termolabile con attività a 37 °C ridotta di circa il 60% nei soggetti omozigoti mutati TT (8), mentre tale attività è ridotta del 30% nei soggetti eterozigoti CT (9). I soggetti omozigoti 677 TT con ina-

deguito apporto alimentare di AF presentano una iperomocisteinemia di grado moderato (10). Al contrario, la mutazione 1298 AC del gene codificante per l'enzima 5.10-MTHFR causa in omozigosi una diminuzione dell'attività enzimatica che non è associata ad un incremento dei valori plasmatici di omocisteina. I soggetti eterozigoti composti 677 CT, 1298 AC presentano un profilo biochimico simile a quello degli omozigoti TT caratterizzato da elevati valori plasmatici di omocisteina e da ridotti livelli sierici di AF (11). L'allele 1298 AC ha una frequenza pari al 9% in Canada e in Olanda, mentre la percentuale di eterozigoti composti 677 CT, 1298 AC è rispettivamente pari a circa il 15 e 20%. I vari gruppi etnici hanno una diversa frequenza della mutazione 677 CT. Tale mutazione genica è particolarmente frequente in Italia, pari a circa il 44%, ma anche in California tra gli Ispanici, pari a circa il 42%, con una prevalenza degli omozigoti TT rispettivamente nelle due popolazioni pari a circa il 18% e 21%. La mutazione 677 CT ha una ridotta frequenza tra i neri Americani (677 CT: 14%, TT: 1%) e nell'Africa subsahariana (677 CT: 6%, TT: 0.5%). In Europa la frequenza degli omozigoti TT varia da valori pari a circa il 18% in Italia a valori intorno all'8% in Germania. In Italia la percentuale maggiore degli omozigoti TT è riscontrabile in Toscana, circa il 30%, ove la frequenza dell'allele T, pari al 53%, supera quello dell'allele C (12). L'elevata frequenza della mutazione 677 CT, soprattutto nelle popolazioni mediterranee, è sorprendente se si considera la sua associazione con un aumentato rischio di malattia trombotica e di malformazioni congenite negli omozigoti TT. Comunque, gli effetti clinici di tale mutazione sono controllabili con una opportuna dieta mediterranea e, inoltre, la mutazione potrebbe determinare un vantaggio selettivo per la conservazione dei folati (13).

ACIDO FOLICO NELLE MALFORMAZIONI CONGENITE

Alcuni studi (14) eseguiti su animali negli anni '50 dimostrarono che il deficit di AF poteva causare malformazioni genito-urinarie e più recenti studi sull'uomo suggerirono che l'AF possedeva un effetto protettivo nei confronti delle anomalie dell'apparato genito-urinario (15) e di altre malformazioni congenite (16). Già 25 anni fa, Laurence et al. (17) in uno studio randomizzato, controllato, in doppio cieco, dimostrarono per la prima volta che la fortificazione con AF della dieta materna determinava una significativa riduzione del rischio di ricorrenza di disturbi del tubo neurale in un campione di donne con un precedente figlio affetto da tale patologia. Dieci anni dopo un importante studio Ungherese (18) evidenziò che la somministrazione di AF durante la gravidanza riduceva non solo la ricor-

renza, ma anche la primitiva insorgenza di tali disturbi. L'AF assunto con la dieta non è prontamente assorbibile come l'AF di sintesi, sia per la degradazione con la cottura dei cibi sia per la coniugazione con l'acido poligluttammico. L'AF di sintesi, essendo la forma più biodisponibile (19), ha ridotto la frequenza di comparsa dei disturbi del tubo neurale. Pertanto, negli Stati Uniti d'America e in Canada sono stati sviluppati dal 1° gennaio 1998 programmi di salute pubblica quali l'aggiunta di AF negli alimenti di largo consumo, come ad esempio la farina, per avere la sicurezza che le donne in età fertile assumessero dosaggi più efficaci per un'opportuna prevenzione. Il livello raccomandato di AF è pari a circa 0.4 mg/die. È stato calcolato che la supplementazione vitaminica di farina, pane e cereali aggiunge alla dieta materna una quota non superiore a 0.1 mg di AF e che solo una piccola parte delle donne in età fertile, assumerà i livelli suggeriti di 0.4 mg/die quale risultato di una dieta fortificata (20). Pertanto, si preferisce la somministrazione di integratori vitaminici alle donne che stanno programmando una gravidanza, aumentando notevolmente la quantità di AF assunto nel periodo periconcezionale. I "Centres for Disease Control and Prevention" Americani (CDC) hanno stimato che se tutte le donne seguissero tali raccomandazioni ci sarebbero ogni anno dalle 2000 alle 3000 gravidanze in meno gravate da spina bifida e altre malformazioni.

Le malformazioni più studiate in relazione all'AF, dopo i disturbi del tubo neurale, sono state la labiopalatoschisi e la palatoschisi. L'alterazione dei valori plasmatici di folati ed omocisteina nelle madri di pazienti affetti da labiopalatoschisi e palatoschisi ha suggerito la possibilità di una predisposizione genetica allo sviluppo di queste malformazioni congenite riconducibile a mutazioni genetiche codificanti per gli enzimi coinvolti nel metabolismo dei folati e dell'omocisteina. In particolare, lo studio di Mills et al. (21), condotto su una popolazione Irlandese con scarso utilizzo periconcezionale di integratori vitaminici, documentò che il genotipo TT per l'enzima 5.10-MTHFR aveva una frequenza di circa il 10% nei controlli, mentre tale percentuale era circa tre volte superiore nei casi di palatoschisi. L'aumento significativo della frequenza del genotipo TT tra i casi di palatoschisi nella popolazione irlandese è suggestivo per un ruolo eziopatogenetico svolto dalla mutazione 677 CT del gene codificante per l'enzima 5.10-MTHFR. Inoltre, è ipotizzabile che l'efficacia della somministrazione di AF in epoca periconcezionale e nei primi mesi di gravidanza possa essere riconducibile al superamento dell'alterazione metabolica determinata dalla variante termolabile della 5.10-MTHFR.

Un ulteriore importante metodo di valutazione del ruolo dell'AF nella prevenzione delle malformazioni

TABELLA I - PRINCIPALI FARMACI CHE ALTERANO IL METABOLISMO DELL'AF. I-DHFR = INIBITORI DELL'ENZIMA DIIDROFOLATOREDDUTTASI, I-AI = INIBITORI DELL'ASSORBIMENTO INTESTINALE

Farmaco	i-DHFR	i-AI
Carbamazepina		sì
Colestiramina		sì
Contraccettivi orali		sì
Fenitoina		sì
Fenobarbital		sì
Metotrexate	sì	
Primidone		sì
Sulfasalazina	sì	
Triamterene	sì	
Trimetoprim	sì	

congenite è stato lo studio di eventuali relazioni tra l'aumento di incidenza di difetti congeniti e l'uso di farmaci antagonisti dell'AF. Il primo farmaco antagonista dell'AF somministrato al genere umano è stato l'aminopterina (22), seguito dal suo analogo: il metotrexate. La dimostrazione che il metotrexate era efficace nel trattamento della leucemia linfoblastica acuta dell'infanzia ha generato un particolare interesse allo sviluppo di sostanze inibenti il metabolismo dell'AF. Il metotrexate inibisce l'enzima diidrofollato-reduttasi che trasforma la struttura metabolicamente inattiva DHF nella forma attiva THF che viene poi convertita in 5.10-MTHF. Ulteriori farmaci capaci di inibire tale enzima sono: il trimetoprim, la pirimetamina, la sulfasalazina e il triamterene. Altri farmaci capaci di alterare il metabolismo dei folati, riducendone l'assorbimento e/o aumentandone la degradazione, corrispondono soprattutto ai farmaci antiepilettici quali la carbamazepina, la fenitoina, il primidone, il fenobarbital, il colestipolo, la colestiramina e i contraccettivi orali (Tab. I). Un recente studio caso controllo eseguito nel Nord America ha evidenziato che l'assunzione di antagonisti dell'AF durante la gravidanza determinava un maggiore rischio di schisi orofacciale nel nascituro (23) con un rischio relativo pari a 2.6 per gli inibitori della diidrofollato-reduttasi e pari a 2.5 per i farmaci antiepilettici. La mancata assunzione di vitamine aumentava il rischio relativo a 4.9 nel caso di assunzione di inibitori della diidrofollato-reduttasi, mentre risultava invariato con l'assunzione di antiepilettici. Pertanto la somministrazione di multivitaminici contenenti AF diminuisce la tossicità degli inibitori della diidrofollato-reduttasi, ma non quella dei farmaci antiepilettici, suggerendo una evidenza indiretta dell'azione protettiva dell'AF verso lo sviluppo di schisi orofacciale.

TEST DI VERIFICA

4) Quale tra questi farmaci non è un inibitore della diidrolfolato-reduttasi?

- a. Metotrexate
- b. Trimetoprim
- c. Sulfasalazina
- d. Carbamazepina
- e. Aminopterina.

5) In quale popolazione è più frequente la mutazione 677 CT del gene codificante per l'enzima MTHFR?

- a. Ungherese
- b. Italiana
- c. Francese
- d. Inglese
- e. Olandese.

6) Quale tra questi genotipi riguardanti l'enzima 5,10-MTHFR determina valori più elevati di omocisteina?

- a. 677 CT
- b. 677 TT
- c. 677 CC
- d. 1298 AA
- e. 1298 AC.

ACIDO FOLICO E INSUFFICIENZA RENALE

I pazienti con insufficienza renale, sia quelli in 4° e 5° stadio sottoposti a terapia medica, sia quelli in 5° stadio in trattamento dialitico, hanno un rischio elevato di deficit di AF per i seguenti motivi (24):

- 1) la dieta con minore apporto di alimenti contenenti tale vitamina;
- 2) la riduzione del suo assorbimento enterico;
- 3) l'alterazione della attività degli enzimi coinvolti nel suo metabolismo;
- 4) il trattamento con eritropoietina determinante un suo maggiore consumo;
- 5) la sua eliminazione durante il trattamento dialitico.

Il deficit di vitamina B6 si riscontra nella maggior parte dei pazienti emodializzati che non assumono complessi multivitaminici, mentre la carenza di vitamina B12 è meno frequente. Pertanto, si ritiene utile la prescrizione di un complesso multivitaminico contenente vitamina B6 alla dose di 10 mg/die, vitamina B12 alla dose di 12 microgrammi/die e AF alla dose di 1 mg/die per migliorare lo stato vitaminico di questi pazienti (25). Comunque, pur normalizzando tale stato, si può rilevare una relazione inversa tra i folati sierici o eritrocitari e i livelli plasmatici di omocisteina (26). Numerose alterazioni del metabolismo dell'AF sono

state dimostrate nella uremia sperimentale e clinica. L'assorbimento intestinale di 5-MTHF è ridotto nei ratti uremici rispetto a quelli di controllo. Tale differenza potrebbe essere attribuita all'uremia piuttosto che ad una alterazione propria degli enterociti (27). Infatti, l'assorbimento enterico dell'AF compiuto dalla folato-coniugasi, un importante enzima capace di trasformare l'AF poliglutamato in monoglutamato, risultava diminuito nei pazienti emodializzati. Tale attività di assorbimento ritornava nei limiti di normalità al termine della seduta dialitica (28), suggerendo la presenza di un inibitore della folato-coniugasi nel plasma dei pazienti uremici. È stato anche dimostrato che il siero dei pazienti uremici inibiva il trasporto transmembrana dell'AF e che l'introduzione di [¹⁴C] 5-MTHF negli acidi nucleici e nelle proteine veniva bloccato dagli anioni accumulati nell'uremia, suggerendo una alterazione dell'assorbimento e dell'utilizzo dell'AF nei pazienti con insufficienza renale avanzata (29, 30). Inoltre, i folati ematici liberi e disponibili per il trasporto transmembrana possono essere ridotti per un aumentato legame con le proteine plasmatiche (31). Questi dati rinforzano l'ipotesi che l'insufficienza renale sia caratterizzata da un deficit relativo di AF. I pazienti uremici potrebbero non raggiungere sufficienti livelli intracellulari di 5-MTHF, anche se i valori dei folati sierici, misurati dalle metodiche standard inidonee a distinguere tra le diverse specie di folati, potrebbero risultare normali (32). Pertanto, è stato proposto che dosi sopra fisiologiche di AF potrebbero essere necessarie per normalizzare i livelli di omocisteina in questi pazienti. I dati della letteratura hanno però indicato che la terapia con AF, efficace a normalizzare i valori plasmatici di omocisteina nei pazienti con trombosi vascolare e normale funzionalità renale (33), è capace di ridurre, ma raramente di normalizzare i valori plasmatici di omocisteina dei pazienti uremici. Infatti, la somministrazione di dosi elevate di AF o di 5-MTHF riduce i valori di omocisteina in modo equivalente tra i due farmaci (34, 35), ma la persistenza di valori di omocisteina superiori alla norma in una grande percentuale dei pazienti trattati, suggerisce che il difetto nell'assorbimento e nella interconversione dei folati non rappresenti l'unica causa di iperomocisteinemia. La maggior parte dei pazienti dializzati trattati con 5 mg/die di AF ha valori plasmatici di omocisteina superiori alla norma, ma dosi maggiori di AF, pari a 15 mg/die (36) o 30-60 mg/die (37), non sono più efficaci di 5 mg/die per la riduzione di tali valori di omocisteina. L'associazione di betaina alla terapia con AF (38), favorente la rimetilazione della omocisteina a metionina, non determina un'ulteriore riduzione dei valori di omocisteina, suggerendo che il processo di rimetilazione betaina-dipendente non è incrementato dalla betaina esogena nei pazienti con una adeguata rimeti-

lazione AF-dipendente. La simile riduzione dei valori di omocisteina nei pazienti trattati con AF o 5-MTHF ha suggerito che l'ulteriore riduzione dei valori di omocisteina nei pazienti con insufficienza renale non è più dipendente da un'alterazione del metabolismo dei folati, ma per lo più dal processo di transulfurazione dell'omocisteina. Infatti, è stato recentemente dimostrato che la terapia multivitaminica B (39), comprendente 5 mg p.o. die di AF, 1 mg i.m. alla settimana di vitamina B12 e 300 mg p.o. di vitamina B6, riduce notevolmente i valori plasmatici di omocisteina, normalizzandoli in più del 70% dei pazienti in dialisi peritoneale. Tale triplice terapia è necessaria (40) per i seguenti motivi:

- 1) la rimetilazione della omocisteina a metionina prevede il 5-MTHF come substrato e la vitamina B12 come cofattore dell'enzima metionina sintetasi;
- 2) la dipendenza dell'omocisteina dall'AF si riduce con la somministrazione di AF generando una nuova correlazione inversa tra omocisteina e vitamina B12 poiché quest'ultima è il cofattore enzimatico utilizzato nel meccanismo di rimetilazione (41);
- 3) la transulfurazione dell'omocisteina a cistationina ed in seguito a cisteina prevede la vitamina B6 come cofattore enzimatico della cistationina beta sintetasi e della cistationina gamma liasi.

I dati della letteratura ci suggeriscono che la terapia con AF non causa gravi effetti collaterali. Diversi Autori hanno eseguito una verifica dei potenziali effetti tossici della terapia farmacologica con AF nei pazienti uremici e non hanno riscontrato alcuna evidenza di tossicità (42), suggerendo che dosi elevate di AF sono ben tollerate e innocue in questo gruppo di pazienti. La dose massima raccomandata (43) di 1 mg/die di AF è determinata dalla capacità dell'AF di nascondere le manifestazioni ematologiche riguardanti la carenza di vitamina B12 con una contemporanea progressione delle complicanze neurologiche (44). Le principali manifestazioni neurologiche da deficit di vitamina B12 sono le parestesie, localizzate prevalentemente agli arti, l'astenia e la riduzione della sensibilità. I pazienti non opportunamente trattati con vitamina B12 possono avere un ulteriore peggioramento delle condizioni cliniche fino all'atassia con demielinizzazione dei cordoni posteriori e laterali del midollo spinale. Inoltre, si possono aggiungere a tali manifestazioni vari disturbi psichici variabili da una lieve irritabilità e da deficit mnemonici fino alla demenza e alla psicosi. Comunque, la misurazione periodica della concentrazione di vitamina B12 e l'utilizzo di vitamina B12 nei supplementi vitaminici dovrebbero eliminare completamente questo rischio. Inoltre, è necessario ricordare che la somministrazione di dosi elevate di AF potrebbe ostacolare l'azione degli anticonvulsivanti e interferire con l'azione terapeutica degli inibitori della diidrofolato reductasi.

ACIDO FOLICO E DISFUNZIONE ENDOTELIALE

La disfunzione endoteliale, esplicitata dall'aumento di livelli circolanti di proteine derivate dall'endotelio e dal deficit vasodilatativo endotelio-dipendente (45), è stata dimostrata nei pazienti con insufficienza renale di grado avanzato, nei pazienti in trattamento dialitico e nei pazienti sottoposti a trapianto di rene. Molti studi hanno recentemente dimostrato che l'AF migliora la disfunzione endoteliale, indipendentemente dalla normalizzazione dei livelli plasmatici di omocisteina. È stato osservato in due studi che la somministrazione di 5-MTHF per via endovenosa (46) e di AF p.o. (47) migliora significativamente il deficit vasodilatativo endotelio-dipendente dei pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare. Inoltre, è stato documentato che il trattamento con AF previene sia l'incremento nella eliminazione di sostanze ossidate dopo carico acuto di grassi in soggetti volontari sani, sia le alterazioni della funzione endoteliale durante un test di carico di metionina in soggetti volontari sani senza modificare i valori plasmatici di omocisteina (48). Sono stati eseguiti degli studi paralleli in vitro per poter spiegare l'effetto vasoprotettivo dei folati, indipendentemente dal metabolismo dell'omocisteina. L'enzima endoteliale ossido nitrico sintetasi produce in condizioni fisiologiche ossido nitrico, ma in condizioni patologiche tale attività determina una maggiore formazione di anione superossido, comportando una alterata biodisponibilità dell'ossido nitrico. Il 5-MTHF modifica l'attività enzimatica aumentando la produzione di ossido nitrico, riducendo la formazione di anione superossido e, inoltre, eliminando lo ione superossido, anche se quest'ultima azione è meno efficace rispetto a quella della vitamina C. Pertanto, l'AF migliora la biodisponibilità dell'ossido nitrico prevenendone la degradazione ossidativa. Una maggiore biodisponibilità dell'ossido nitrico migliora la funzione endoteliale e protegge la parete vascolare dalle alterazioni aterogeniche (49). Sebbene la disfunzione endoteliale nell'insufficienza renale di grado avanzato sia determinata da un aumentato stress ossidativo e da una minore biodisponibilità dell'ossido nitrico, gli effetti dell'AF sull'endotelio nei pazienti uremici non hanno dato risultati particolarmente convincenti. I pazienti in emodialisi trattati con AF p.o. non hanno mostrato significativi miglioramenti della vasodilatazione endotelio-dipendente e dei marcatori endoteliali, anche se la percentuale di riduzione dei valori plasmatici di omocisteina era limitata a circa il 20%, e l'eventuale esclusione dall'analisi dei pazienti fumatori con pregresso evento cardiovascolare comportava una tendenza al miglioramento della vasodilatazione endotelio-dipendente (50). Anche in un altro studio su pazienti in trattamento dialitico peritoneale non si è evi-

denziato alcun miglioramento della funzione endoteliale (51), pur ottenendo in questo caso una maggiore riduzione dei valori di omocisteina. Entrambi gli studi non prevedevano un gruppo di controllo e quindi non era possibile stabilire se la funzione endoteliale sarebbe comunque peggiorata, mascherando conseguentemente l'effetto benefico del trattamento. Infine, un *trial* randomizzato condotto nei pazienti con insufficienza renale di grado elevato trattati con AF ha mostrato una lieve riduzione dei valori di omocisteina e non ha evidenziato un miglioramento della vasodilatazione endotelio-dipendente e delle concentrazioni del fattore di von-Willebrand (52). Questa apparente inadeguatezza dell'AF a migliorare la funzione endoteliale nei pazienti con insufficienza renale può avere diverse spiegazioni. Innanzitutto i pazienti con insufficienza renale cronica hanno innumerevoli fattori di rischio capaci di alterare l'endotelio, oltre ai valori elevati di omocisteina e, infatti, in questi studi non c'era alcuna significativa relazione tra i valori basali di omocisteina e la funzione endoteliale. Inoltre, se si considera la disfunzione endoteliale associata ad elevati valori di omocisteina, la funzione endoteliale potrebbe migliorare dopo opportuna terapia multivitaminica B capace di normalizzare o di determinare notevoli riduzioni dei valori di omocisteina. A conferma di ciò, un recente studio (53) non controllato ha evidenziato che i pazienti emodializzati sottoposti a terapia sequenziale con AF e vitamina B12 con una importante riduzione dei valori di omocisteinemia, soprattutto nei sottogruppi TT e CT per il gene MTHFR, mostravano un significativo miglioramento della funzione endoteliale.

ACIDO FOLICO NELLA MALATTIA CARDIOVASCOLARE

La malattia cardiovascolare è la più importante causa di morbilità e mortalità nella popolazione generale, ma anche nei pazienti uremici sottoposti a trattamento dialitico. La mortalità annua di tali pazienti è pari a circa il 14% e le cause cardiovascolari sono responsabili per più del 50% dei decessi. Recentemente, sia lo studio osservazionale DOPPS (*Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study*) ha evidenziato che il continuo trattamento con le vitamine idrosolubili riduce la mortalità cardiovascolare (54), sia uno studio prospettico monocentrico (55) ha evidenziato che l'AF, pur non normalizzando i valori di omocisteina, diminuisce la morbilità cardiovascolare dei pazienti dializzati. In accordo con questi dati, Yap et al. (56) hanno dimostrato che la terapia vitaminica B, pur non normalizzando i valori di omocisteina, riduce il rischio di eventi cardiovascolari nei pazienti omocistinurici. L'effetto dell'AF sull'incidenza degli eventi cardiovascolari è stato anche analizzato nella popolazio-

ne generale. Yang et al. (57) hanno recentemente pubblicato che, in seguito alla fortificazione degli alimenti con AF, la popolazione Americana e Canadese ha avuto una significativa riduzione degli eventi fatali cerebrovascolari rispetto sia alla stessa popolazione Americana e Canadese prima dell'inizio del programma, sia alla popolazione di controllo Inglese e Gallese non sottoposte alla fortificazione con AF. Inoltre, queste significative differenze riguardanti gli eventi cardiovascolari sono state riscontrate anche per gli effetti di tale programma sulla comparsa delle malformazioni congenite. Questi risultati sono particolarmente interessanti, anche se non ottenuti da uno studio prospettico randomizzato che, pur rappresentando il miglior metodo di intervento terapeutico, è difficilmente eseguibile senza alcuna imperfezione metodologica. Così, una recente metanalisi eseguita da Bazzano et al. (58), considerando gli effetti della terapia con AF sulla prevenzione secondaria della malattia cardiovascolare, non ha trovato né benefici, né effetti di tale terapia sul rischio di morbilità e mortalità cardiovascolare (Tab. II). Però, gli stessi Autori hanno riscontrato, escludendo lo studio VISP pubblicato da Toole et al. (59), un effetto protettivo della terapia con AF sull'incidenza di eventi cerebrovascolari (RR, 0.76; 95% IC, 0.63-0.93) e, quindi, hanno concluso che è necessario attendere i risultati degli studi in corso per poter probabilmente avere una definitiva risposta a questa importante domanda di salute pubblica. Il *trial* VISP ha evidenziato che la terapia con AF non riduce significativamente l'incidenza di eventi cardiovascolari che, però, risultano meno frequenti nei pazienti con valori più bassi di omocisteina. Tale studio ha due principali imprecisioni metodologiche: l'assenza di un gruppo placebo e la presenza di un programma di fortificazione degli alimenti con AF che ha aumentato i valori di folatemia e ridotto i valori di omocisteina in entrambi i gruppi di pazienti con, conseguentemente, una piccola differenza tra i valori sierici di omocisteina nei due gruppi. In seguito ad una rivalutazione metodologica dello studio, gli Autori (60) hanno osservato una significativa riduzione della incidenza di eventi cardiovascolari compositi nei pazienti trattati con alte dosi di vitamine e con elevati livelli plasmatici di vitamina B12. Anche nello studio NORVIT (*Norwegian Vitamin Trial*), i livelli plasmatici di omocisteina erano simili nei pazienti trattati e non trattati con AF, e questi ultimi mostravano un imprevisto aumento dei valori di folatemia durante lo studio (61). Inoltre, i livelli sierici di omocisteina non erano un criterio di inclusione nello studio e, quindi, una grande parte dei pazienti presentava all'inizio dello studio valori normali o lievemente aumentati di omocisteina. Lo studio HOPE-2 (*Heart Outcomes Prevention Evaluation*), pubblicato con lo studio NORVIT sullo stesso numero del *New England Journal of Medicine* (62), è caratterizza-

TABELLA II - DOSI DI AF-B6-B12, RIDUZIONE DEI VALORI DI OMOCISTEINA DAL LIVELLO BASALE, RISCHIO RELATIVO DI ICTUS NEI PAZIENTI IN DIALISI O CON INSUFFICIENZA RENALE AVANZATA (a) E CON FUNZIONE RENALE NORMALE O LIEVEMENTE RIDOTTA (b) NEGLI STUDI PROSPETTICI A LUNGO TERMINE

Autori	RR ictus	Tipo pz	AF	B6	B12	Riduzione di omocisteina
Zoungas S, et al. (64)	0.45	a	15 mg			-2.4
Righetti M, et al. (55)	0.55	a	5 mg			-15.1
HOPE-2 Inv. (62)	0.76	b	2.5 mg	50mg	1mg	-3.2
Bønnaa KH, et al. (61)	0.91	b	0.8 mg	40mg	0.4mg	-3.8
Toole JF, et al. (59)	1.04	b	2.5 mg	25mg	0.4mg	-2.1

to dalle stesse importanti imprecisioni metodologiche: i valori sierici di omocisteina non erano un criterio di inclusione, una grande parte della popolazione studiata non aveva iperomocisteinemia e deficit di folati poiché proveniva da aree geografiche, come gli USA ed il Canada, fortificate con alimenti contenenti AF e, inoltre, tali pazienti avevano già assunto terapia vitaminica B prima della partecipazione allo studio. Anche gli Autori dello studio HOPE 2 hanno affermato che il trattamento con AF non riduce la percentuale di incidenza di eventi cardiovascolari, ma in modo sorprendente hanno ritenuto poco importante la riduzione degli eventi cardiovascolari combinati (111 vs 147 casi) e degli eventi cerebrovascolari non fatali (84 vs 117, RR: 0.72, 95% IC, 0.54-0.95, p=0.02) nei pazienti trattati con AF rispetto ai controlli. Inoltre, è importante segnalare che tutti gli studi considerati dalla metanalisi di Bazzano et al., ad eccezione dello studio Italiano, mostrano una lieve riduzione dei valori di omocisteina che potrebbe derivare da un periodo osservazionale relativamente troppo breve e, pertanto, una impossibilità metodologica a mostrare l'effetto protettivo della terapia con AF sugli eventi cardiovascolari. Infatti, l'effetto benefico della terapia con AF sulla malattia cardiovascolare si osserva nei pazienti iperomocisteinemici, quando la supplementazione viene attuata precocemente e per un lungo periodo di tempo.

CONCLUSIONI

Negli ultimi 80 anni sono state scoperte importanti proprietà biologiche dell'AF. Il deficit di tale vitamina può essere la causa di anemia megaloblastica, malformazioni congenite, trombosi vascolari e alterazioni endoteliali. Inoltre, la diretta correlazione tra i valori di AF e la capacità di metilazione del DNA ha permesso di evidenziare un'associazione inversa tra i livelli sierici dei folati e l'incidenza di varie neoplasie tra cui il

cancro colon-rettale (63). Pertanto, l'assunzione di dosi modeste di AF potrebbe ridurre l'incidenza di importanti patologie come la malattia cardiovascolare e le neoplasie che rappresentano le cause più importanti di mortalità nella popolazione generale e nei pazienti affetti da insufficienza renale. Naturalmente è necessario attendere i risultati degli studi clinici in corso per poter trarre eventuali conclusioni ed idonee Linee Guida di trattamento. È pertanto necessario adottare regimi dietetici corretti poiché il "cibo come medicina" è il primo passo per ridurre il rischio di morbilità e mortalità, come già indicato da Ippocrate 2500 anni fa.

TEST DI VERIFICA

7) Gli studi controllati randomizzati hanno evidenziato che la terapia con AF riduce il rischio relativo di:

- Angina
- Infarto non fatale
- Infarto fatale
- Ictus
- Vasculopatia periferica.

8) Il dosaggio massimo utilizzato di folina in studi prospettici è stato di:

- 5 mg/die
- 10 mg/die
- 15 mg/die
- 30 mg/die
- 60 mg/die.

9) Quale tipo di neoplasia è maggiormente associata a deficit di acido folico?

- Linfoma
- Mieloma
- Neoplasia renale
- Neoplasia colon-rettale
- Neoplasia epatica.

RIASSUNTO

Questa rassegna descrive la storia dell'acido folico, il metabolismo e le interazioni con le malattie e i farmaci. Negli ultimi anni l'interesse scientifico per l'acido folico è aumentato a causa di un suo importante ruolo in varie patologie come l'anemia macrocitica, le malformazioni congenite, le trombosi vascolari, la malattia aterosclerotica e le neoplasie. In particolare viene analizzato

l'importante ruolo dell'acido folico in queste malattie e le recenti novità riguardanti la terapia con acido folico nei pazienti affetti da insufficienza renale.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

BIBLIOGRAFIA

- Roe DA. Lucy Wills (1888-1964): a biographical sketch. *J Nutr* 1978; 108: 1379-83.
- Wills L. Treatment of "pernicious anemia of pregnancy" and "tropical anemia" with special reference to yeast extract as curative agent. *Br Med J* 1931; 1: 1059-64.
- Mitchell HK, Snell EE, Williams RJ. The concentration of "folic acid". *J Am Chem Soc* 1941; 63: 2284-7.
- Angier RB, Boothe JH, Hutchings BL, et al. Synthesis of a compound identical with the L. Casei factor isolated from liver. *Science* 1945; 102: 227-8.
- Stokstad ELR. Early work with folic acid. *Fed Proc* 1979; 38: 2696-8.
- Blakley RL. The biochemistry of folic acid and related pteridines. In: North Holland Research Monographs. *Frontiers of Biology*. North Holland Publishing Company, Amsterdam. 1969; 13: 1-569.
- Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab* 2000; 71: 121-6.
- Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHF-R). *Thromb Haemost* 1997; 78: 523-6.
- Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalysyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 414-21.
- 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.
- Weisberg I, Tran P, Christensen B. A second genetic polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHF-R) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64: 169-72.
- Botto LD, Yang Q. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variant and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 862-77.
- Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG. MTHFR C677T polymorphism and skin color: The white man's blackness. *Kidney Int* 2004; 66: 2444.
- Monie IW, Nelson MM, Evans HM. Abnormalities of the urinary system of rat embryos resulting from maternal pteroylglutamic acid deficiency. *Anat Rec* 1954; 120: 119-36.
- Li DK, Daling JR, Mueller BA, Hickok DE, Fantel AG, Weiss NS. Periconceptional multivitamin use in relation to the risk of congenital urinary tract anomalies. *Epidemiology* 1995; 6: 212-8.
- Czeizel AE. Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation. *BMJ* 1993; 306: 1645-8.
- Laurence KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H. Double blind randomized controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural tube defects. *Br Med J* 1981; 282: 1509.
- Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992; 327: 1832-5.
- Erikson JD. Primary prevention of neural tube defects (NTD) with folic acid. *Acta Paediatr Lat* 1995; 48: 85-93.
- Klein NW. Folic acid and prevention of spina bifida. *JAMA* 1996; 275: 1636.
- Mills JL, Kirke PN, Molloy AM. Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am J Med Genet* 1999; 86: 71-4.
- Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF, Wolff JA. Temporary remissions in acute leukaemia in children produced by folic acid antagonist 4-aminopteroyl-glutamic acid (Aminopterin). *New Engl J Med* 1948; 238: 787-93.
- Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 2000; 343: 1608-14.
- Descombes E, Hanck AB, Fellay G. Water soluble vitamins in chronic hemodialysis patients and need for supplementation. *Kidney Int* 1993; 43: 1319-28.
- Bostom AG, Shemin D, Bagley P, et al. Controlled comparison of L-5-methyltetrahydrofolate versus folic acid for the treatment of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Circulation* 2000; 101: 2829-32.
- Suliman ME, Divino Filho JC, Barany P, et al. Effects of high-dose folic acid and pyridoxine on plasma and erythrocyte sulphur amino acids in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1287-96.
- Said HM, Vaziri ND, Kariger RH, Hollander D. Intestinal absorption of 5-methyltetrahydrofolate in experimental uremia. *Acta Vitaminol Enzymol* 1984; 6: 339-46.
- Vivant EJ, Tamura T, Johnston KE, et al. Plasma folate conjugase activities and folate concentrations in patients receiving hemodialysis. *J Nutr Biochem* 1994; 5: 504-8.
- Jennette JC, Goldman ID. Inhibition of the membrane transport of folates by anions retained in uremia. *J Lab Clin Med* 1975; 86: 834-43.
- Corghetti E, Patrosso C, Bamonti F, et al. Supplementazione e.v. di acido folinico e vitamina B12 e concentrazioni di omocisteina nei pazienti emodializzati. *G Ital Nefrol* 2002; 3: 301-7.
- Retief FP, Heyns AP, Oosthuizen M, Reenen OR. Aspects of

- folate metabolism in renal failure. *Br J Haematol* 1977; 36: 405-15.
32. Touam M, Zingraff J, Jungers P, et al. Effective correction of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients by intravenous folinic acid and pyridoxine therapy. *Kidney Int* 1999; 56: 2292-6.
 33. Homocysteine Lowering Trialists Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analyses of randomised trials. *BMJ* 1998; 316: 894-8.
 34. Ghandour H, Bagley PJ, Shemin D, et al. Distribution of plasma folate forms in hemodialysis patients receiving high daily doses of L-folinic or folic acid. *Kidney Int* 2002; 62: 2246-9.
 35. Ducloux D, Aboubakr A, Motte G, et al. Hyper-homocysteinemia therapy in hemodialysis patients: folinic versus folic acid in combination with vitamin B6 and B12. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 865-70.
 36. Righetti M, Ferrario GM, Milani S, et al. Effects of folic acid treatment on homocysteine levels and vascular disease in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 9: P1 19-24.
 37. Sunder-Plassmann G, Födinger M, Buchmayer H, et al. Effect of high dose folic acid therapy on hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients: results of the Vienna Multicenter Study. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1106-16.
 38. Van Guldener C, Janssen MJFM, Lambert J, et al. No change in impaired endothelial function after long-term folic acid therapy of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 106-12.
 39. Righetti M, Tommasi A, Lagona C, La Rosa L, Uccellini M, Sessa A. Effective homocysteine-lowering vitamin B treatment in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 2004; 24: 373-7.
 40. Righetti M. Homocysteine and folate therapy in dialysis patients. *Lett Drug Des Disc* 2006; 3: 351-5.
 41. 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.
 42. Bostom AG, Shemin D, Lapane KL, et al. High dose B-vitamin treatment of hyperhomocysteinemia in dialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49: 147-52.
 43. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for thiamine, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington DC, National Academy Press 2000; 150-95. CORREGGERE
 44. Butterworth CE Jr, Tamura T. Folic acid safety and toxicity: a brief review. *Am J Clin Nutr* 1989; 50: 353-8.
 45. Thambyrajah J, Landray MJ, McGlynn FJ, et al. Abnormalities of endothelial function in patients with predialysis renal failure. *Heart* 2000; 83: 205-9.
 46. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, et al. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 97: 237-41.
 47. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, et al. Effects of oral folic acid supplementation on endothelial function in familial hypercholesterolemia. A randomised placebo controlled trial. *Circulation* 1999; 100: 335-8.
 48. Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, et al. Endothelial dysfunction by acute hyperhomocysteinemia: restoration by folic acid. *Clin Sci* 1999; 96: 235-9.
 49. Stroes ES, van Faassen EE, Yo M, et al. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 2000; 86: 1129-34.
 50. van Guldener C, Janssen MJ, Lambert J, et al. No change in impaired endothelial function after long-term folic acid therapy of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 106-12.
 51. van Guldener C, Janssen MJ, Lambert J, et al. Folic acid treatment of hyperhomocysteinemia in peritoneal dialysis patients: no change in endothelial function after long-term therapy. *Perit Dial Int* 1998; 18: 282-9.
 52. Thambyrajah J, Landray MJ, McGlynn FJ, et al. Does folic acid decrease plasma homocysteine and improve endothelial function in patients with predialysis renal failure? *Circulation* 2000; 102: 871-5.
 53. Buccianti G, Raselli S, Baragetti I, et al. 5-methyltetrahydrofolate restores endothelial function in uraemic patients on convective haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 857-64.
 54. Fissell RB, Bragg-Gresham JL, Gillespie BW, et al. International variation in vitamin prescription and association with mortality in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis* 2004; 44: 293-9.
 55. Righetti M, Serbelloni P, Milani S, Ferrario GM. Homocysteine-lowering vitamin B treatment decreases cardiovascular events in hemodialysis patients. *Blood Purif* 2006; 24: 379-86.
 56. Yap S, Boers GHJ, Wilcken B, et al. Vascular outcome in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency treated chronically: a multicenter observational study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 2080-5.
 57. Yang Q, Botto LD, Erickson JD, et al. Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002. *Circulation* 2006; 113: 1335-43.
 58. Bazzano LA, Reynolds K, Holder KN, He Y. Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases. *JAMA* 2006; 296: 2720-6.
 59. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, et al. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 565-75.
 60. Spence JD, Bang H, Chambless LE, Stampfer MJ. Vitamin intervention for stroke prevention trial. An efficacy analysis. *Stroke* 2005; 36: 2404-9.
 61. Bønaa KH, Njølstad I, Ueland PM, et al., NORVIT Trial Investigators. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 354: 1578-88.
 62. The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 2006; 354: 1567-77.
 63. Kim YI. Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. *J Nutr* 2005; 135: 2703-9.
 64. Zoungas S, McGrath BP, Branley P, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Atherosclerosis and Folic Acid Supplementation Trial (ASFAST) in chronic renal failure. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 1108-16.