

# Rassegne

## Le vitamine del gruppo B come nuove variabili correlate al rischio cardiovascolare

Monica Granieri, Francesco Iachini Bellisarii, Raffaele De Caterina

Istituto di Cardiologia, Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti

### Key words:

Atherosclerosis;  
Cardiovascular risk;  
Folic acid;  
Homocysteine;  
Vitamins.

The nutritional status and plasma concentrations of some group B vitamins, namely vitamin B<sub>6</sub>, vitamin B<sub>12</sub> and folic acid, have recently emerged as inverse correlates of cardiovascular risk, and several experimental and clinical studies, these latter mostly retrospective and case-control studies, indicate a defect of such vitamins as capable of promoting the progression of atherosclerosis. Since all these vitamins are implicated in homocysteine metabolism, and since homocysteine has a well-recognized relationship with cardiovascular risk, the simplest hypothesis to explain the relationship of vitamin B<sub>6</sub>, vitamin B<sub>12</sub> and folic acid on the one hand, and cardiovascular risk on the other is that this relationship is mediated by plasma levels of homocysteine. The most convincing literature data for the existence of a relationship with cardiovascular risk are for vitamin B<sub>6</sub> and folic acid. These vitamins, however, have also a series of *in vitro* effects indicating a direct antiatherogenic action, and the results of several clinical studies, especially for vitamin B<sub>6</sub>, indicate an inverse relationship with cardiovascular risk at least in part independent of homocysteinemia. A further confirmation of these data is important to devise future intervention strategies in primary and secondary prophylaxis of atherosclerotic vascular disease.

(Ital Heart J Suppl 2005; 6 (1): 1-16)

© 2005 CEPI Srl

Ricevuto il 17 settembre 2004; nuova stesura il 3 gennaio 2005; accettato il 5 gennaio 2005.

### Per la corrispondenza:

Prof. Raffaele De Caterina  
Istituto di Cardiologia  
Università degli Studi  
"G. d'Annunzio"  
Ospedale San Camillo  
de Lellis  
Via Forlanini, 50  
66100 Chieti  
E-mail: rdeccater@unich.it

### Introduzione

Le vitamine sono molecole organiche eterogenee non sintetizzate dalle cellule animali *de novo*, ma fornite in piccole quantità dall'ambiente, che funzionano come cofattori di importanti vie metaboliche. La principale fonte ambientale delle vitamine è la dieta. Le vitamine sono indispensabili per la sopravvivenza delle cellule, coadiuvando l'attività di molti enzimi e risultando indispensabili per l'innesco di specifiche reazioni da essi catalizzate. A seconda della loro solubilità in acqua o nei grassi si distinguono *vitamine idrosolubili* e *vitamine liposolubili*. Le *vitamine idrosolubili* vengono immagazzinate nell'organismo in maniera limitata, per cui, al fine di mantenere costante il livello di saturazione dei tessuti, sono necessarie frequenti assunzioni di questi fattori dietetici. Esse comprendono le vitamine del gruppo B (tiamina o vitamina B<sub>1</sub>, riboflavina o vitamina B<sub>2</sub>, acido nicotinico, acido pantotemico, piridossina o vitamina B<sub>6</sub>, cianocobalamina o vitamina B<sub>12</sub>, biotina, acido folico), e la vitamina C o acido ascorbico. Le *vitamine liposolubili* comprendono: vitamina A o carotene, vitamina D<sub>3</sub> o calcife-

rolo, vitamina E o tocoferolo, vitamina K o naftochinone.

In questa rassegna focalizzeremo la nostra attenzione su alcune vitamine del complesso B, in particolare vitamina B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e acido folico, per il crescente interesse scientifico circa una loro relazione con le malattie cardiovascolari.

### Vitamina B<sub>6</sub>

Il fabbisogno medio giornaliero di vitamina B<sub>6</sub><sup>1</sup> è di circa 1.5 mg in individui che ingeriscono 100 g di proteine al giorno. Il fabbisogno aumenta con l'aumentare delle proteine nella dieta. Fonti alimentari di questa vitamina sono carne, fegato, pane e cereali integrali, soia e verdure<sup>2</sup>. Importanti aspetti riconducibili ad una sua carenza riguardano la cute (lesioni di tipo seborroico localizzate intorno agli occhi, al naso ed alla bocca, alle quali si associano una glosite ed una stomatite), il sistema nervoso (episodi convulsivi, sindrome del tunnel carpale), l'eritropoiesi.

La vitamina B<sub>6</sub> esiste in natura in tre forme: piridossina, piridossale, piridossamina (Fig. 1). Ciascuna di queste tre forme della

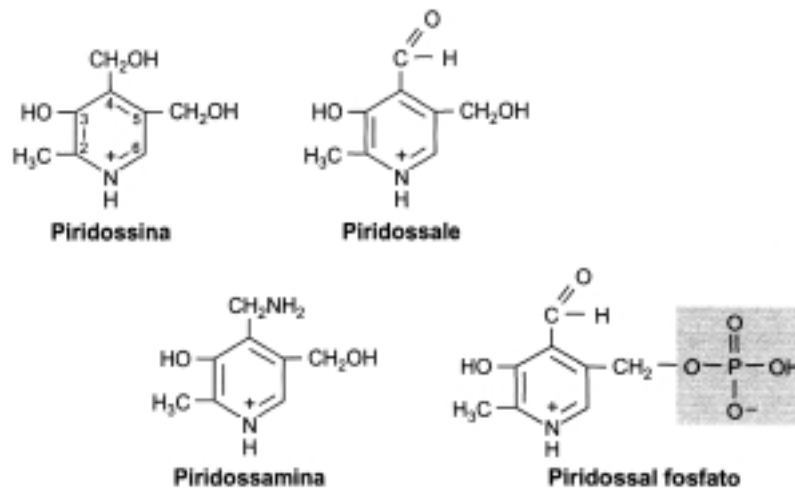


Figura 1. Forme presenti in natura della vitamina B<sub>6</sub> e struttura del piridossal fosfato.

vitamina B<sub>6</sub> può essere prontamente utilizzata da tutte le specie di mammiferi dopo conversione nel fegato a piridossale 5'-fosfato (piridossal fosfato-PLP) (Fig. 1), che è la forma attiva della vitamina. Il PLP è coinvolto come coenzima in numerose trasformazioni metaboliche degli aminoacidi, tra cui la decarbossilazione, la transaminazione e la racemizzazione, e partecipa inoltre alle reazioni enzimatiche che interessano gli aminoacidi che contengono zolfo e gli idrossi-aminoacidi<sup>3,4</sup>. La vitamina B<sub>6</sub> è coinvolta nel metabolismo del triptofano per la sua trasformazione in NAD<sup>+</sup>. Il PLP prende parte alla sintesi dei neurotrasmettitori serotonina e noradrenalina a partire rispettivamente da triptofano e tiroxina; alla sintesi degli sfingolipidi necessari alla formazione della mielina; alla reazione di transaminazione degli aminoacidi a chetoacidi ad opera degli enzimi glutammico-ossalacetico transaminasi e glutammico-piruvico transaminasi. Anche la conversione della metionina a cisteina è una reazione PLP-dipendente. Il PLP partecipa inoltre alla biosintesi dell'acido amino-levulinico, un precursore dell'eme, ed è anche un componente essenziale dell'enzima glicogeno-fosforilasi, dove si trova legato covalentemente ad un residuo di lisina, con la funzione di stabilizzare la molecola. È anche possibile che abbia un effetto diretto sul metabolismo dell'insulina<sup>3,4</sup>.

### Acido folico

L'acido folico (dal latino *folium*, foglia) è stato trovato per la prima volta nelle foglie degli spinaci. Molte fonti alimentari sono ricche di folati, specialmente le verdure verdi fresche, il fegato, il lievito ed alcuni frutti. Tuttavia, una cottura protratta può distruggere fino al 90% del suo contenuto in tali cibi. Il fabbisogno giornaliero minimo, nell'adulto normale, è di 50 µg, mentre la donna gravida o in allattamento ed i pazienti con elevati ricambi cellulari possono richiedere fino a 100-200 µg o più al giorno<sup>5,6</sup>. La carenza di folato si rico-

nosce dal suo effetto sul sistema emopoietico in termini di anemia megaloblastica e, molto raramente, come causa di anomalie neurologiche<sup>7</sup>.

La forma molecolare più semplice dell'acido folico è l'acido pteroilglutammico (PteGlu<sub>1</sub>) (Fig. 2) composto da tre caratteristiche unità: 1) un anello pteridinico legato da un ponte metilenico, 2) all'acido para-amino-benzoico, che è unito da un legame amidico, 3) all'acido glutammico.

Il PteGlu<sub>1</sub>, pur essendo la forma comune dell'acido folico, non è il suo principale congenere presente negli alimenti, né è il coenzima attivo per il metabolismo intracellulare. Dopo essere stato assorbito, il PteGlu<sub>1</sub>, viene infatti ridotto e trasformato in acido tetraidrofolico (Fig. 2), il coenzima attivo. Vi sono diversi derivati dell'acido tetraidrofolico (N<sup>5</sup>-metil-tetraidrofolato,

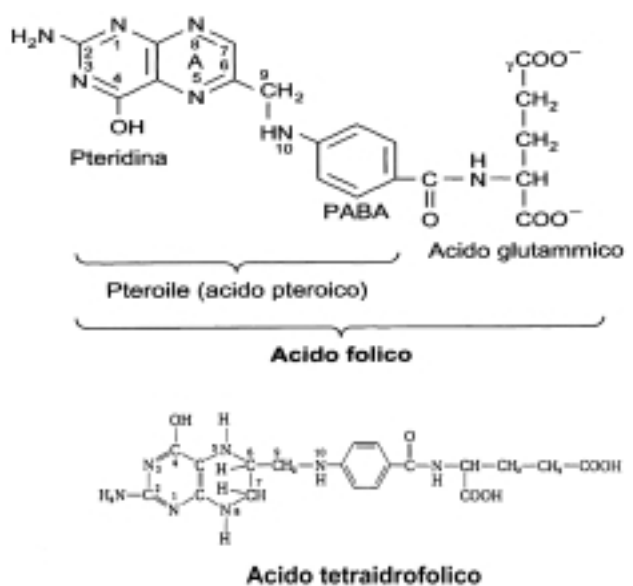


Figura 2. Struttura dell'acido folico (acido pteroilglutammico) e dell'acido tetraidrofolico. PABA = acido para-amino-benzoico.

N5,10-metilene-tetraidrofolato, N5-formil-tetraidrofolato, N10-formil-tetra-idrofolato, N5,10-metenil-tetra-idrofolato, ecc.), ciascuno dei quali svolge un ruolo specifico nel metabolismo intracellulare<sup>5</sup>.

La principale funzione dell'acido tetraidrofolico e dei suoi derivati è quella di trasportatore intermedio di gruppi idrossimetile (-CH<sub>2</sub>OH), formile (-CHO), o metile (CH<sub>3</sub>), che vengono prelevati da alcune molecole ed utilizzati per la sintesi di altri composti in un gran numero di reazioni enzimatiche. I gruppi metilici donati dal N5-metil-tetraidrofolato sono usati per formare metil-cobalamina, che poi agisce da donatore di un gruppo metilico per la conversione dell'omocisteina in metionina. Nella reazione di conversione della serina in glicina, il tetraidrofolato funge da accettore di un gruppo metilene dalla serina ed utilizza il PLP come cofattore. Da tale reazione risulta la formazione di N5,10-metilene-tetraidrofolato, coenzima essenziale per sintesi di timidilato. Infatti, l'N5,10-metilene-tetraidrofolato dona un gruppo metilene ed equivalenti riducenti al desossiridilato per la sintesi di timidilato, tappa limitante la velocità della sintesi del DNA. L'acido tetraidrofolico agisce da accettore di un gruppo formiminico nella conversione dell'acido formiminoglutammico in acido glutammico nel metabolismo dell'istidina. L'N5,10-metenil-tetraidrofolato e l'N10-formil-tetraidrofolato partecipano ciascuno ad una tappa della sintesi dei nucleotidi purinici. Il tetraidrofolato e l'N10-formil-tetraidrofolato vengono utilizzati nella reazione reversibile di utilizzazione o formazione di formiato. Dai sopracitati processi biochimici, che vedono coinvolti i diversi coenzimi dell'acido folico, si evince il suo ruolo nella duplicazione del DNA<sup>8</sup>, con delle conseguenze dunque ad ampio spettro nella fisiologia cellulare.

## Vitamina B<sub>12</sub>

La vitamina B<sub>12</sub> non è sintetizzata da alcun organismo del regno animale o vegetale, ma deriva, come praticamente unica sua fonte, da certi microrganismi che crescono nel terreno, nei liquami, nell'acqua, o nel lume intestinale, e che sono capaci di sintetizzarla<sup>9,10</sup>. I prodotti vegetali sono privi di vitamina B<sub>12</sub><sup>11</sup>, salvo che non siano stati contaminati da tali microrganismi, e quindi gli animali devono ricorrere alla sintesi della vitamina nel proprio canale alimentare o all'ingestione di prodotti animali che la contengano. Il fabbisogno giornaliero è di 3-5 µg/die, che può essere soddisfatto dal consumo di alimenti di origine animale (fegato) e di carne. Stati carenziali si possono osservare nei casi di un'insufficiente produzione gastrica di fattore intrinseco (necessario per il suo assorbimento da parte dello stomaco) e/o di acido cloridrico per atrofia gastrica o interventi chirurgici sullo stomaco; in pazienti con gravi sindromi da malassorbimento (patologie pancreatiche e ileali); in persone da molto tempo vegetariane. La carenza di vitamina B<sub>12</sub> si riconosce clinicamente per il suo impatto sia sul sistema emopoietico (anemia megaloblastica), che su quello nervoso (rigonfiamento dei neuroni mielinizzati, demielinizzazione e morte delle cellule neuronali).

La vitamina B<sub>12</sub> ha una struttura ad anello complessa (Fig. 3), simile a quella della porfirina dell'eme, ma più ricca di idrogeno. Le tre parti principali della molecola sono:

- un gruppo planare o nucleo corrinico, struttura anulare con quattro anelli pirrolici ridotti legati ad un atomo di cobalto;
- un 5,6-dimetil-benzimidazolo, che si lega, quasi ad

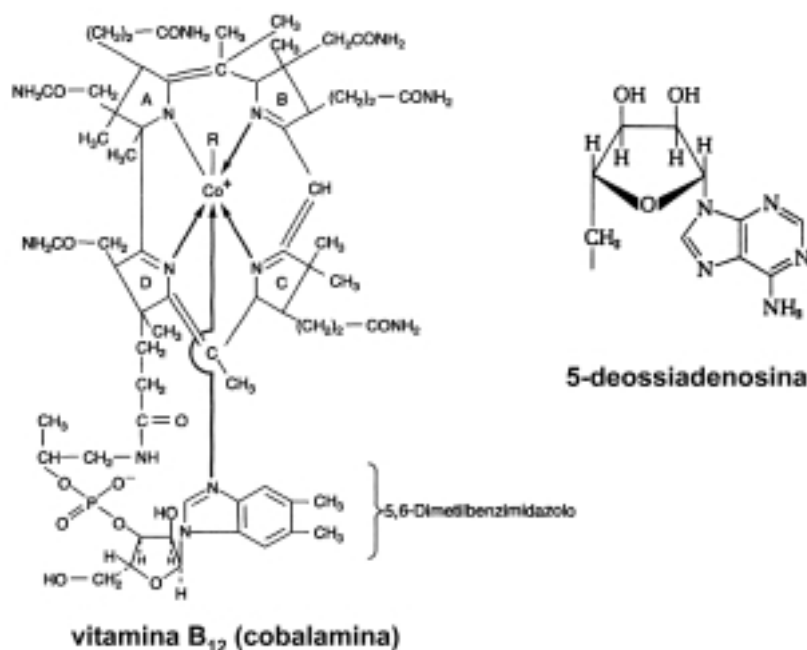


Figura 3. Struttura della vitamina B<sub>12</sub> (cobalamina) e 5-deossiadenosina, gruppo R della vitamina B<sub>12</sub>.



tionina è in eccesso, l'omocisteina viene coinvolta in una reazione di transulfurazione ad opera di enzimi PLP-dipendenti, viene cioè irreversibilmente transulfurata a cisteina dall'enzima cistationina-beta-sintetasi, che richiede come cofattore la vitamina B<sub>6</sub>. Alternativamente, l'omocisteina può essere rimetilata a metionina o attraverso un processo che richiede l'enzima metionina-sintetasi (che necessita, come cofattore, della vitamina B<sub>12</sub> e, come donatore di metili, dell'N5-metil-tetraidrofolato, un derivato dell'acido folico); oppure attraverso l'enzima omocisteina-betaina metiltransferasi, che utilizza la betaina come donatore di metili. Deficit di vitamina B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e folato sono quindi chiaramente responsabili di un alterato metabolismo dell'omocisteina e, conseguentemente, del suo accumulo nel plasma<sup>18</sup>.

### Evidenze per una relazione tra vitamine del gruppo B e rischio cardiovascolare

Sebbene la relazione tra status vitaminico e malattia cardiovascolare sia stata trovata, a volte, essere assente<sup>19-23</sup>, in letteratura sono presenti diversi studi che mostrano relazioni tra vitamina B<sub>6</sub>, acido folico e vitamina B<sub>12</sub> da una parte, e malattia vascolare aterosclerotica. L'aumentato rischio cardiovascolare da basso status vitaminico è generalmente stato ascritto ad un'aumentata concentrazione plasmatica di omocisteina, che già dal 1969 è stata indicata come un fattore di rischio per la malattia vascolare aterosclerotica<sup>24</sup>. Da allora studi clinici ed epidemiologici hanno evidenziato una relazione tra i livelli di omocisteina plasmatica totale e malattia coronarica, malattia vascolare periferica, ictus e trombosi venosa. Tuttavia più recentemente si è posta l'attenzione sulla possibilità che vitamine del gruppo B possano proteggere dal rischio di malattie cardiovascolari indipendentemente dall'omocisteina. In un recentissimo studio animale, Zhou et al.<sup>25</sup> hanno valutato la relazione tra omocisteina plasmatica, vitamine riducenti l'omocisteina e aterosclerosi. Dai loro risultati si ricava che l'effetto antiaterogeno delle vitamine del gruppo B nei topi normo-omocisteinemicici era indipendente dall'omocisteina, suggerendo che il meccanismo con il quale le vitamine del gruppo B attenuano l'aterosclerosi non è attraverso un miglioramento dell'omocisteinemia.

L'evidenza clinica di una relazione tra status vitaminico e malattia vascolare verrà ora rivista in dettaglio per ciascuna delle tre suddette vitamine.

**Vitamina B<sub>6</sub> e rischio cardiovascolare.** Sin dal 1949, Rinehart e Greenberg<sup>26</sup>, in uno studio animale, osservarono lesioni aterosclerotiche, simili a quelle umane, nelle scimmie tenute a dieta priva di vitamina B<sub>6</sub>. Anche se non c'è dimostrazione che la normalizzazione dei livelli plasmatici di vitamina B<sub>6</sub> comporti la normalizzazione del rischio di aterosclerosi e delle sue com-

plicanze trombotiche, ci sono delle indicazioni indirette in letteratura che la supplementazione di alte dosi di vitamina B<sub>6</sub> possa essere benefica. Ad esempio, uno studio retrospettivo<sup>27</sup> condotto su pazienti con sindrome del tunnel carpale o altre malattie degenerative di natura reumatica associate a deficit di vitamina B<sub>6</sub><sup>28,29</sup>, trattati con la supplementazione di tale vitamina, mostrava che questi pazienti avevano un'incidenza significativamente più bassa di infarto miocardico rispetto a pazienti simili non trattati con vitamina B<sub>6</sub>. Selhub et al.<sup>30</sup> hanno riportato un'associazione tra inadeguato stato di vitamina B<sub>6</sub> ed aterosclerosi carotidea, indipendentemente dall'omocisteinemia. Inoltre pazienti che avevano sofferto di infarto del miocardio avevano livelli plasmatici di PLP significativamente più bassi rispetto ai controlli<sup>31</sup>. Kok et al.<sup>32</sup>, in un ulteriore studio caso-controllo di 84 pazienti con infarto miocardico acuto ed un numero uguale di controlli, mostrarono che i livelli di vitamina B<sub>6</sub> erano ridotti nei pazienti con infarto miocardico ed associati ad aumentato rischio di aterosclerosi, indipendentemente dagli aumentati livelli di omocisteinemia. Che ci sia un probabile meccanismo diretto per cui più alti livelli plasmatici di vitamina B<sub>6</sub> possano ridurre il rischio cardiovascolare è suggerito da numerosi studi. Robinson et al.<sup>33</sup> dimostrarono, in uno studio caso-controllo in 304 pazienti con malattia coronarica e 231 controlli, che, in aggiunta ad un legame con il metabolismo dell'omocisteina, bassi livelli di PLP conferivano un rischio indipendente per malattie coronariche. Mentre il rischio per malattia coronarica nei pazienti con deficit di folato e vitamina B<sub>12</sub> era di 0.7 e 1.6 rispettivamente (entrambi non significativi), il rischio di malattia coronarica in soggetti con basso PLP, dopo aggiustamento per tutti i fattori di rischio tradizionali, era di 3.8 (intervallo di confidenza [IC] 95% 1.1-13.7, p = 0.04). Quando l'iperomocisteinemia era inclusa in un'analisi multivariata, un odds ratio di 4.3 per malattia coronarica persisteva nei soggetti con basso PLP. In aggiunta, quando i pazienti con coesistenza di malattia coronarica e deficit vitaminico venivano esclusi, la concentrazione di omocisteina rimaneva più alta rispetto ai controlli. Nello studio multicentrico caso-controllo dell'European Concerted Action Project, comprendente 750 casi con malattia aterosclerotica vascolare e 800 controlli di età media di 60 anni, più bassi livelli di vitamina B<sub>6</sub> erano associati ad un aumentato rischio di malattia vascolare aterotrombotica indipendentemente dai livelli di omocisteinemia<sup>34-36</sup>. In particolare, Verhoef et al.<sup>36</sup> hanno riscontrato che in entrambi i sessi, ma soprattutto nelle donne in premenopausa, bassi livelli circolanti di vitamina B<sub>6</sub> conferiscono un aumento statisticamente significativo del rischio di malattia vascolare, da 2 a 3 volte, indipendente dall'omocisteinemia. Cattaneo et al.<sup>37</sup> hanno condotto uno studio caso-controllo paragonando 397 casi con precedente trombosi venosa profonda con 585 controlli sani. Da esso si riscontrava una relazione in-

versa tra vitamina B<sub>6</sub> e trombosi venosa profonda. Altri livelli di omocisteinemia prima e dopo un carico orale di metionina, e bassi livelli plasmatici di vitamina B<sub>6</sub> erano associati entrambi ad un elevato rischio di trombosi venosa profonda indipendentemente dai fattori di rischio noti. Inoltre, l'associazione di bassi livelli di vitamina B<sub>6</sub> con il rischio di trombosi venosa profonda era indipendente dai livelli di omocisteinemia prima e dopo carico orale di metionina. Uno studio prospettico che valutava il ruolo di alte concentrazioni plasmatiche di omocisteina e bassi livelli di vitamina B<sub>6</sub> come fattori di rischio per complicanze aterotrombotiche in pazienti trapiantati di cuore mostrava un aumento di complicanze e di mortalità totale, per bassi livelli di vitamina B<sub>6</sub><sup>38</sup>. Studi caso-controllo<sup>33,35</sup> e prospettici (Atherosclerosis Risk in Communities [ARIC] study<sup>20</sup>) hanno ribadito un'associazione tra bassi livelli di vitamina B<sub>6</sub> e rischio vascolare, compreso quello coronarico. Anche in questi studi il rischio era indipendente dall'iperomocisteinemia, prima<sup>20,35</sup> e dopo carico orale di metionina<sup>33</sup>. Nell'ARIC study, bassi valori di PLP erano associati a malattia coronarica sia nell'analisi univariata che in quella multivariata, mostrando una correlazione inversa indipendente con gli eventi coronarici. La relazione della vitamina B<sub>6</sub> con le malattie vascolari non poteva essere spiegata solo sulla base dell'anormale metabolismo dell'omocisteina<sup>35</sup>. Un altro studio prospettico di folato e vitamina B<sub>6</sub> sul rischio di infarto miocardico, condotto su medici americani con un follow-up di 7.5 anni, mostrava un trend verso l'associazione, ma a livelli non statisticamente significativi<sup>39</sup>. Un altro ampio studio prospettico, il Nurses' Health Study, condotto su 80 000 donne con un follow-up di 14 anni, dimostra che l'uso di preparazioni multivitaminiche contenenti anche vitamina B<sub>6</sub> era associato ad una più bassa incidenza di eventi coronarici<sup>40</sup>. In particolare, in una sottoanalisi in cui si prendeva in considerazione il ruolo della vitamina B<sub>6</sub>, indipendentemente dalle altre vitamine, il rischio relativo delle donne nel quintile più alto di introduzione alimentare di vitamina B<sub>6</sub> era pari a 0.49 (IC 95% 0.40-0.61), paragonato al rischio per malattia coronarica delle donne nel quintile più basso<sup>40</sup>. In un piccolo studio di intervento randomizzato in doppio cieco, è stato dimostrato che la supplementazione con piridossina (100 mg/die per 10 settimane) può significativamente migliorare la funzione endoteliale, e sono stati notati effetti benefici sulla riduzione dell'aterosclerosi da trapianto in assenza di variazioni delle concentrazioni dell'omocisteinemia<sup>41</sup>. Ciò suggerisce che l'effetto protettivo della vitamina B<sub>6</sub> è mediato non solo dalla diminuzione dell'omocisteinemia, ma anche da altri meccanismi. La somministrazione di alte dosi di vitamina B<sub>6</sub> a pazienti con omocistinuria, causata da deficit dell'attività della cistationina-beta-sintetasi, è associata ad una considerevole riduzione del rischio trombotico venoso ed arterioso qui notevolmente alto, nonostante la mancata normalizzazione dei livelli plasmatici di omocisteina<sup>42</sup>. In

studi di follow-up di pazienti con omocistinuria, trattati con vitamina B<sub>6</sub>, il rischio cardiovascolare diminuiva pur mantenendosi alti i livelli di omocisteinemia, suggerendo che la vitamina B<sub>6</sub> agisce con un meccanismo diretto, indipendente dall'effetto di riduzione dell'omocisteinemia<sup>43</sup>. Un confronto fra le differenti caratteristiche degli studi descritti è riportato nella tabella [20,27,30-33,35-42].

*Possibili meccanismi di indipendenza.* Vari meccanismi sono stati proposti per spiegare un effetto diretto della vitamina B<sub>6</sub> nel ridurre o prevenire il danno vascolare. Il deficit di vitamina B<sub>6</sub> è stato associato al danno di enzimi coinvolti nel mantenimento dell'integrità strutturale della parete arteriosa<sup>44</sup>, all'interferenza con il metabolismo del colesterolo<sup>45</sup>, e ad un'aumentata funzione piastrinica<sup>46</sup> o della coagulazione, quest'ultima possibilmente mediata da una riduzione dei livelli di antitrombina III, la cui attività aumenta dopo somministrazione di vitamina B<sub>6</sub><sup>47</sup>. La forma attivata della vitamina B<sub>6</sub>, PLP, inibisce l'aggregazione piastrinica *ex vivo*<sup>48</sup> e prolunga il tempo di sanguinamento<sup>49</sup>.

Un meccanismo alternativo è che bassi livelli di PLP nelle malattie cardiovascolari siano legati ai processi infiammatori, probabilmente importanti nella patogenesi dell'aterosclerosi. Tale affermazione parte dal riscontro di una relazione tra bassi livelli di PLP ed altre patologie, quali l'artrite reumatoide, relazione che non può essere totalmente spiegata sulla base di un'anormale metabolismo dell'omocisteina<sup>50</sup>. Ciò è stato recentemente provato da un'associazione altamente significativa tra bassi livelli circolanti di PLP ed elevazione del marker infiammatorio proteina C reattiva, indipendentemente dai livelli plasmatici di omocisteina<sup>51</sup>. Questa osservazione potrebbe suggerire un uso della vitamina B<sub>6</sub> in malattie su base infiammatoria, e rappresenta un possibile meccanismo per spiegare i bassi livelli di vitamina B<sub>6</sub> nelle malattie cardiovascolari.

**Vitamina B<sub>12</sub> e rischio cardiovascolare.** Una serie di evidenze in letteratura supporta l'ipotesi di una relazione inversa tra vitamina B<sub>12</sub> e rischio cardiovascolare, mediata dalla riduzione dei livelli sierici di omocisteina<sup>52-54</sup>.

L'unico studio caso-controllo in cui basse concentrazioni di vitamina B<sub>12</sub> sono state associate ad un aumentato rischio di aterosclerosi coronarica, in maniera indipendente, almeno in parte, dai livelli di omocisteinemia, è tuttavia quello di Siri et al.<sup>21</sup>, in cui, dopo aggiustamento per valori normali di omocisteinemia, il rischio rimaneva maggiore nei pazienti con più bassi livelli di vitamina B<sub>12</sub>. Tuttavia, in uno studio multicentrico caso-controllo<sup>36</sup>, nell'ARIC study<sup>20</sup> ed in altri due studi prospettici con un follow-up rispettivamente di 10.3<sup>55</sup> e 29 anni<sup>22</sup>, non è stata trovata alcuna relazione indipendente tra vitamina B<sub>12</sub> e rischio cardiovascolare. La relazione tra livelli di vitamina B<sub>12</sub> e rischio cardiovascolare, indipendentemente dai livelli di omocisteina, appare dunque assai controversa.

**Tabella I.** Studi epidemiologici e di intervento a supporto della relazione tra vitamina B<sub>6</sub> e malattia vascolare.

Autori	Anno	Popolazione studiata	Follow-up	Risultati principali
<b>Studi trasversali</b>				
Serfontein et al. <sup>31</sup>	1985	15 pazienti con IMA/28 controlli		I livelli plasmatici di PLP sono più bassi rispetto ai controlli I livelli plasmatici di PLP sono più bassi rispetto ai controlli Bassi livelli plasmatici di vitamina B <sub>6</sub> sono associati a stenosi carotidea Bassi livelli di PLP e rischio cardiovascolare sono associati indipendentemente
Kok et al. <sup>32</sup>	1989	84 pazienti con IMA/84 controlli		
Selhub et al. <sup>30</sup>	1995	1041 pazienti anziani		
Robinson et al. <sup>33</sup>	1995	304 pazienti con cardiopatia ischemica/ 231 controlli		
Robinson et al. <sup>35</sup>	1998	750 pazienti con malattia aterosclerotica vascolare documentata/800 controlli		Bassi livelli di PLP sono associati a malattia aterosclerotica indipendentemente dall'omocisteinemia
Verhoef et al. <sup>36</sup>	1999	750 pazienti con malattia aterosclerotica vascolare/800 controlli		Bassi livelli circolanti di vitamina B <sub>6</sub> determinano un aumento da 2 a 3 volte del rischio vascolare soprattutto nelle donne in premenopausa indipendentemente dall'omocisteinemia
Cattaneo et al. <sup>37</sup>	2001	397 pazienti con pregressa trombotosi venosa profonda/585 controlli		L'associazione di bassi livelli di vitamina B <sub>6</sub> e aumento del rischio di trombosi venosa profonda è indipendente dall'omocisteinemia
<b>Studi retrospettivi</b>				
Ellis e McCully <sup>27</sup>	1995	13 pazienti con sindrome del tunnel carpale e deficit di vitamina B <sub>6</sub>	5 anni	La somministrazione di vitamina B <sub>6</sub> ha un effetto preventivo sulla progressione della malattia coronarica
<b>Studi prospettivi</b>				
Chasan-Faber et al. <sup>39*</sup>	1996	14 916 medici americani	7.5 anni	Basso introito di vitamina B <sub>6</sub> con la dieta aumenta il rischio di IMA Bassi livelli plasmatici di PLP comportano un aumento del rischio di malattia aterosclerotica indipendentemente dall'omocisteinemia
Folsom et al. <sup>20</sup>	1998	15 792 tra uomini e donne sani	3.3 anni	
Rimm et al. <sup>40</sup>	1998	80 082 donne americane	14 anni	Un maggiore introito di vitamina B <sub>6</sub> riduce il rischio di coronaropatia Bassi livelli di vitamina B <sub>6</sub> sono causa di maggiori complicanze aterotrombotiche
Nahlawi et al. <sup>38</sup>	2002	160 pazienti trapiantati di cuore	28 ± 9 mesi	
<b>Studi di intervento</b>				
Wilcken e Wilcken <sup>42</sup>	1997	40 pazienti con omocistinuria	11 anni	La somministrazione di vitamina B <sub>6</sub> riduce il rischio trombotico arterioso e venoso senza cambiare l'omocisteinemia
Miner et al. <sup>41</sup>	2001	11 pazienti trapiantati di cuore	Al termine di 10 settimane di trattamento	La somministrazione di piridossina migliora la funzione endoteliale

IMA = infarto miocardico acuto; PLP = piridossal fosfato. \* nested case-control study.

**Folato e rischio cardiovascolare.** Cresce sempre più l'interesse per il possibile ruolo che l'acido folico potrebbe svolgere nella prevenzione primaria e secondaria delle malattie cardiovascolari. Vari studi epidemiologici supportano un legame tra status di folato e malattia vascolare aterosclerotica. Risultati favorevoli a sostegno di tale ipotesi sono stati tratti da piccoli studi trasversali<sup>30,56,57</sup>, caso-controllo<sup>58-61</sup>, retrospettivi di coorte<sup>62,63</sup> e prospettici<sup>39,64-66</sup>, che investigavano la relazione tra status di folato e tutte le malattie cardiovascolari come endpoint. Tuttavia, in un gruppo altrettanto ampio di altri studi<sup>19,22,33,67,68</sup>, l'esistenza di un'associazione è messa in dubbio. In un'analisi più dettagliata del Nurses' Health Study, uno studio prospettico in cui si esaminava, tra l'altro, il ruolo dei folati provenienti dalla dieta e dalle supplementazioni, indipendentemente dalle altre vitamine, è emerso che un'introduzione alimentare maggiore di folati, nelle due modalità di assunzione, conferiva una riduzione del rischio di malattia coronarica rispetto ad un consumo minore (dieta, rischio relativo 0.78, IC 95% 0.61-1.01; supplementi, rischio relativo 0.76, IC 95% 0.59-0.98). Il rischio relativo per una dieta più ricca in folati era comunque identico dopo esclusione del 33.7% di donne che facevano uso di preparati multivitaminici<sup>40</sup>.

Altri due studi di coorte, rispettivamente retrospettivo e prospettico, che ponevano in relazione le concentrazioni plasmatiche di folato con la malattia coronarica, hanno trovato relazioni inverse sia negli uomini che nelle donne<sup>63</sup>, o solo negli uomini<sup>65</sup>. In un recente studio prospettico, de Bree et al.<sup>55</sup> hanno trovato una significativa riduzione del rischio relativo di mortalità per malattie coronariche solo nelle donne con alte concentrazioni di folato sierico, in linea con i risultati di Morrison et al.<sup>62</sup> che hanno rilevato un'associazione statisticamente significativa fra livelli sierici di folato e rischio di morte per cardiopatia ischemica, con odds ratio di 1.69 (IC 95% 1.10-2.61) per individui nella categoria a più bassi livelli di folato sierico (< 3 ng/ml) paragonata con la categoria a livelli più alti (> 6 ng/ml). D'altra parte, una terapia con methotrexate, un farmaco antiproliferativo anche usato come antireumatico, che interferisce con il metabolismo del folato, è stata recentemente segnalata come promotrice dell'aterosclerosi<sup>69</sup>. Di contro, un recente studio clinico che ha valutato l'acido folico (0.5 mg/die), in una popolazione di 300 pazienti con malattia coronarica stabile in trattamento con statine, con un follow-up di 24 mesi, in prevenzione secondaria, lo ha ritenuto non efficace nel rallentare la progressione della malattia<sup>23</sup>. Una comune mutazione della 5,10-metilene-tetraidrofolato reduttasi, che causa ridotta attività dell'enzima che catalizza la riduzione del 5,10-metilene-tetraidrofolato a 5-metil-tetraidrofolato (la forma principale del folato circolante) è risultata associata a malattia coronarica in piccoli studi trasversali<sup>56,57,70</sup> e come fattore di rischio per malattie vascolari in una metanalisi di otto studi caso-controllo, soprattutto nei riguardi degli omozigoti per tale mutazione<sup>71</sup>. Diversi altri ampi studi<sup>20,72-75</sup> ed un'altra

metanalisi<sup>76</sup> tuttavia non confermano l'esistenza di tale associazione. Bassi livelli sierici di folato ed aumentato rischio cardiovascolare sono stati fino a questo punto spiegati soltanto attraverso la loro relazione con l'omocisteinemia, ma ulteriori possibili meccanismi, ancora non chiari, probabilmente li legano. Da un grande studio caso-controllo multicentrico condotto in Europa (European Concerted Action Project) su 750 casi e 800 controlli, si ricava che bassi livelli di folato sierico sono correlati ad un aumentato rischio di malattia cardiovascolare, solo in parte spiegato dai più alti livelli di omocisteinemia<sup>34-36</sup>. Uno studio caso-controllo su 255 pazienti coronarici ospedalizzati e 114 controlli ha pure suggerito come il folato influenzi il rischio coronarico attraverso meccanismi diversi da quelli mediati dall'omocisteina<sup>77</sup>. Un ulteriore studio caso-controllo, con 171 pazienti con infarto miocardico non fatale e 171 controlli, in una popolazione mediterranea che consumava alimenti vegetali naturali come principale risorsa di acido folico, fornisce pure evidenze che l'introduzione alimentare di folato con la dieta possa essere un fattore protettivo indipendente per l'infarto miocardico<sup>78</sup>. Un confronto tra le diverse caratteristiche degli studi descritti, a conferma o a smentita di un'associazione causale tra folato e malattia cardiovascolare, è riportato rispettivamente nelle tabelle II e III<sup>19,22,23,30,33,35,36,39,40,55-58,60-66,71-78</sup>.

La disfunzione endoteliale è ormai considerata evento iniziale nella fisiopatologia delle malattie cardiovascolari. È sempre più evidente, infatti, la relazione tra disfunzione endoteliale e presenza di fattori di rischio cardiovascolare<sup>79</sup>, ischemia miocardica<sup>80,81</sup>, aumentata incidenza di eventi cardiovascolari e aumentata progressione della malattia aterosclerotica<sup>82,83</sup>. Esistono in letteratura forti evidenze per cui il miglioramento della funzione endoteliale comporta una riduzione del rischio cardiovascolare. A tale proposito, la somministrazione di acido folico (10 mg/die per 8 settimane) in soggetti con iperomocisteinemia lievemente aumentata, ma peraltro sani, migliora la funzione endoteliale, misurata con la vasodilatazione mediata dal flusso, rispetto a quella ottenuta dopo supplementazione di placebo<sup>84</sup>. Il folato (5 mg/die per 6 settimane) migliorava la funzione endoteliale, con aumento della vasodilatazione mediata dal flusso, in un altro studio di intervento condotto su 18 soggetti sani iperomocisteinemicici<sup>85</sup>. La somministrazione di folato in dose singola (20 mg) o dosi multiple (5 mg/die per 5 settimane) è risultata utile per prevenire la temporanea disfunzione endoteliale indotta dal carico orale di metionina in volontari sani<sup>86,87</sup>. La vasodilatazione mediata dal flusso dell'arteria brachiale aumentava dopo terapia con folato (5 mg/die per 4 mesi + vitamine antiossidanti<sup>88</sup>; 5 mg/die per 8 settimane + vitamina B<sub>12</sub><sup>89</sup>; 5 mg/die per 6 settimane<sup>90</sup>) anche nei pazienti iperomocisteinemicici con malattia coronarica stabile arruolati in altri tre studi di intervento<sup>88-90</sup>. Questi dati supportano l'ipotesi che riducendo i livelli plasmatici di omocisteinemia nei pazienti iperomocisteinemicici si può ridurre la disfunzione endoteliale. Tuttavia numerosi

**Tabella II.** Studi epidemiologici a supporto della relazione tra folato e malattia vascolare.

Autori	Anno	Popolazione studiata	Follow-up (anni)	Risultati principali
<b>Studi trasversali</b> Kang et al. <sup>56</sup>	1993	339 pazienti sottoposti a coronarografia		La mutazione del gene della MTHF riduttasi è associata a malattia coronarica
Pancharuniti et al. <sup>58</sup>	1994	101 maschi bianchi con malattia aterosclerotica coronarica/108		Aumentando i livelli sierici di folato si riduce il rischio di malattie cardiovascolari
Selhub et al. <sup>30</sup>	1995	1041 pazienti anziani		Bassi livelli plasmatici di folato sono associati a stenosi carotidea
Morita et al. <sup>57</sup>	1997	778 uomini giapponesi		L'omozigosi per la mutazione del gene per la MTHF riduttasi è significativamente associata alla malattia coronarica
Kluijtmans et al. <sup>71</sup>	1997	735 pazienti con cardiopatia ischemica/1250 controlli		L'omozigosi per la mutazione del gene della 5,10-MTHF riduttasi è associata a cardiopatia ischemica
Schwartz et al. <sup>60</sup>	1997	79 donne giovani con IMA/386 controlli		Bassi livelli di folato plasmatico sono associati ad IMA
Robinson et al. <sup>35</sup>	1998	750 pazienti con malattia vascolare aterosclerotica documentata/800 controlli		Bassi livelli di folato conferiscono un aumentato rischio di aterosclerosi solo in parte legato all'iperomocisteinemia
Verhoef et al. <sup>36</sup>	1999	544 uomini con malattia aterosclerotica vascolare/800 controlli		Bassi livelli di folato conferiscono un aumento del 50% del rischio di aterosclerosi
Bunout et al. <sup>61</sup>	2000	84 pazienti con malattia aterosclerotica coronarica e vascolare periferica/84 controlli		Bassi livelli di folato conferiscono un aumentato rischio di aterosclerosi coronarica indipendentemente dai livelli di omocisteina
Silberberg et al. <sup>77</sup>	2001	255 pazienti ospedalizzati con malattia coronarica/114 controlli		Una dieta più ricca di folato è un fattore protettivo per l'IMA
Hernandez-Diaz et al. <sup>78</sup>	2002	171 pazienti con primo IMA non fatale/171 controlli		
<b>Studi retrospettivi</b> Morrison et al. <sup>62</sup>	1996	5056 tra uomini e donne liberi da malattia coronarica	15	Bassi livelli sierici di folato aumentano il rischio di malattia cardiovascolare fatale
Giles et al. <sup>63</sup>	1998	1921 adulti sani	20	Bassi livelli sierici di folato sono associati a malattia cardiovascolare
<b>Studi prospettici</b> Chasan-Faber et al. <sup>39*</sup>	1996	14 916 medici americani	7.5	Basso introito di folato con la dieta aumenta il rischio di IMA
Rimm et al. <sup>40</sup>	1998	80 082 donne americane	14	Un maggiore introito di folato riduce il rischio di coronaropatia
Loria et al. <sup>64</sup>	2000	689 tra uomini e donne senza diabete e liberi da malattia	12-16	Basse concentrazioni di folato sierico aumentano la mortalità da cause cardiovascolari
Voutilainen et al. <sup>65</sup>	2000	734 uomini liberi da malattia cardiovascolare	5.3	Livelli medio-alti di folato sierico riducono gli eventi coronarici
Voutilainen et al. <sup>66</sup>	2001	1980 uomini liberi da malattia cardiovascolare	10	C'è una significativa associazione inversa tra livelli medio-alti di folato sierico ed eventi coronarici
de Bree et al. <sup>55</sup>	2003	36 000 soggetti liberi da malattia cardiovascolare	8-13	Solo nelle donne alti livelli di folato sierico sono associati con una protezione statisticamente significativa da malattia coronarica fatale

IMA = infarto miocardico acuto; MTHF = metilene-tetraidrofolato. \* nested case-control study.

**Tabella III.** Studi epidemiologici e di intervento con assenza di relazione tra folato e malattia vascolare.

Autori	Anno	Popolazione studiata	Follow-up	Risultati principali
Studi trasversali Robinson et al. <sup>33</sup>	1995	304 pazienti con cardiopatia ischemica/231 controlli		Bassi livelli di folato sierico non sono associati ad un aumento del rischio di malattia coronarica
Schmitz et al. <sup>73</sup>	1996	190 pazienti con IMA/188 controlli		L'omozigosi per la mutazione del gene della MTHF riduttasi non è associata ad aumentato rischio di cardiopatia ischemica
Anderson et al. <sup>74</sup>	1997	200 pazienti sottoposti a coronarografia per IMA e sospetta cardiopatia ischemica/544 controlli; 510 pazienti con severa malattia coronarica/168 controlli		La mutazione del gene della MTHF riduttasi non è in relazione ad evidenze di aterosclerosi e IMA
Verhoef et al. <sup>19</sup>	1997	131 tra uomini e donne sottoposti a coronarografia/101 controlli		I livelli di folato cellulare sono più alti nei casi che nei controlli: non c'è relazione inversa
Brattstrom et al. <sup>76*</sup>	1998	5869 pazienti con malattia cardiovascolare/6644 controlli		La mutazione del gene della MTHF riduttasi non è associata a rischio cardiovascolare
Studi prospettici Ma et al. <sup>72**</sup>	1996	293 pazienti con IMA/290 controlli	8 anni	Il polimorfismo per la mutazione del gene della MTHF riduttasi non è associato a cardiopatia ischemica
Verhoef et al. <sup>75**</sup>	1998	500 uomini con malattia coronarica non fatale/500 controlli	6 anni	Uomini con genotipo omozigote per la mutazione della MTHF riduttasi non hanno un aumento del rischio di cardiopatia ischemica
Hung et al. <sup>22</sup>	2003	2950 tra uomini e donne di cui 2314 liberi da malattia cardiovascolare	29 anni	Concentrazioni più basse di folato non aumentano il rischio di malattie cardiovascolari fatali
Studi di intervento Liem et al. <sup>23</sup>	2003	300 pazienti con malattia coronarica stabile randomizzati a 0.5 mg di acido folico	24 mesi	L'acido folico non riduce gli endpoint clinici

IMA = infarto miocardico acuto; MTHF = metilene-tetraidrofolato. \* metanalisi di 23 studi caso-controllo; \*\* nested case-control study.

studi sperimentali hanno valutato gli effetti terapeutici e preventivi della somministrazione orale di acido folico, rilevando effetti benefici di quest'ultimo anche nei pazienti con un normale metabolismo dell'omocisteina. Tra essi, Verhaar et al.<sup>91,92</sup> hanno mostrato che la somministrazione arteriosa di 0-10  $\mu\text{g}/100$  ml/min per 5 min di 5,10-metil-tetraidrofolato e/o la supplementazione orale di acido folico (5 mg/die per 4 settimane) possono ristabilire la funzione endoteliale nei pazienti con ipercolesterolemia familiare ma normali livelli plasmatici di omocisteina. La risposta era immediata e non aveva effetti sui livelli di omocisteinemia. Il trattamento con acido folico (10 mg per 2 settimane) può prevenire la disfunzione endoteliale indotta dall'iperlipidemia postprandiale nei volontari sani<sup>93</sup>. Vermeulen et al.<sup>94</sup> hanno dimostrato che la terapia con acido folico (5 mg/die per 2 anni) diminuisce la frequenza di positività al test da sforzo in fratelli sani di pazienti con malattia aterosclerotica prematura. A supporto di questa ipotesi, più recentemente, Doshi et al.<sup>90</sup> hanno riportato che alte dosi di acido folico (5 mg/die per 6 settimane), in pazienti con aterosclerosi coronarica, aumentano marcatamente, dopo 1 ora, i livelli plasmatici di folato e, dopo 2 ore, la dilatazione flusso-mediata. Tuttavia i livelli di omocisteina totale e libera non cambiano significativamente a 3 e a 4 ore. Il miglioramento della funzione endoteliale, ancor prima di una riduzione significativa dell'omocisteinemia libera e totale, si avrebbe quindi con un meccanismo largamente indipendente da essa<sup>95</sup>. La supplementazione di acido folico (5 mg/die per 4 settimane) in pazienti trapiantati di cuore non ha migliorato la funzione endoteliale rispetto a quelli trattati con placebo o vitamina B<sub>6</sub><sup>41</sup>. Il fumo di sigaretta è associato ad aumentate concentrazioni di omocisteina, disfunzione endoteliale e aterosclerosi. In due studi clinici randomizzati che valutavano gli effetti dell'acido folico (5 mg/die per 4 settimane) nella prevenzione primaria cardiovascolare in fumatori ad alto rischio si evince che vi sono suoi effetti significativamente positivi sulla funzione vascolare<sup>96,97</sup> e sulla pressione arteriosa<sup>96</sup>, indipendentemente dall'effetto di riduzione dell'omocisteinemia. Dati più approfonditi relativi agli studi di intervento con acido folico sulla funzione endoteliale sono riportati nella tabella IV<sup>41,84-89,90-95,97</sup>.

*Possibili meccanismi di indipendenza.* L'effetto benefico del folato sulla funzione endoteliale, indipendentemente dalle variazioni dei livelli plasmatici di omocisteinemia<sup>86,90,91</sup>, potrebbe spiegarsi con la sua capacità di ridurre le concentrazioni intracellulari di anione superossido endoteliale e di aumentare la produzione di ossido nitrico (NO) o di allungarne l'emivita<sup>90</sup>. In effetti nell'ipercolesterolemia, un disordine associato ad aumentato stress ossidativo, esperimenti *in vitro* suggeriscono un effetto antiossidante dei folati dovuto ad un ridotto catabolismo dell'NO, ad un'attiva influenza sull'attività enzimatica della NO-sintasi endoteliale (eNOS), ad una ridotta produzione di superossido<sup>91,92</sup>

ed ad un'azione antiossidante diretta<sup>98</sup>. In una recente rassegna<sup>99</sup> che ha esaminato sistematicamente le evidenze sperimentali per i meccanismi di una possibile azione benefica di sostanze quali tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), acidi grassi polinsaturi, NO, vitamina C e acido folico nei confronti di patologie vascolari, al folato vengono ascritte proprietà di aumentare la sintesi di NO endoteliale<sup>98</sup>, svolgere azioni antinfiammatorie, stimolare la rigenerazione della BH<sub>4</sub> endogena – un cofattore necessario per la sintesi di NO endoteliale –<sup>100,101</sup>, inibire la generazione di superossido intracellulare<sup>90</sup>, aumentare l'emivita dell'NO<sup>91</sup>, aumentare la concentrazione di acidi grassi omega-3<sup>102</sup>, che a loro volta favoriscono la sintesi di NO endoteliale. Queste proprietà del folato sono indipendenti dalla sua capacità di ridurre i livelli plasmatici di omocisteina<sup>99</sup>. Da ciò emerge che acido folico e funzione endoteliale sono legati dal metabolismo dell'NO. La biosintesi dell'NO dalle cellule endoteliali è criticamente dipendente dalla biodisponibilità del cofattore dell'eNOS BH<sub>4</sub>, che stimola la conversione della L-arginina a L-citrullina fino alla formazione dell'NO ad opera delle NO-sintasi<sup>103-106</sup>. La BH<sub>4</sub> agisce come cofattore trasferendo elettroni durante l'ossidazione dell'arginina<sup>107</sup> e venendo ossidata nella forma inattiva diidrobiopterina chinonoide (qBH<sub>2</sub>)<sup>108</sup>. La BH<sub>4</sub> è attiva solo nella sua forma ridotta, instabile. La NO-sintasi, in concomitanza di un deficit di BH<sub>4</sub>, oltre ad una ridotta formazione di NO, è causa di un'aumentata formazione di radicali liberi dell'ossigeno compreso l'anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)<sup>109-111</sup>. Tale processo è chiamato "disaccoppiamento dell'eNOS". L'eccessiva formazione di O<sub>2</sub><sup>-</sup> a sua volta favorisce la reazione di O<sub>2</sub><sup>-</sup> con NO, limitandone l'attività biologica ed inattivandolo<sup>112</sup>. La BH<sub>4</sub> esogena ripristina l'attività enzimatica<sup>106,113,114</sup>. La produzione di superossido vascolare appare mediata dal "disaccoppiamento dell'eNOS", correlata in gran parte alla ridotta biodisponibilità di BH<sub>4</sub>, in numerosi modelli animali di vasculopatia, quali aterosclerosi<sup>115</sup>, diabete<sup>116-118</sup> e iperomocisteinemia<sup>119</sup>. L'acido folico è in grado di ridurre il catabolismo dell'NO proprio attraverso la rigenerazione enzimatica della BH<sub>4</sub><sup>91,100,120</sup>, l'incremento del legame della BH<sub>4</sub> all'eNOS, l'inibizione di altre fonti di superossido quali xantina e/o NADPH ossidasi<sup>92</sup>, ed un effetto antiossidante diretto<sup>98</sup>. Alla deplezione di NADPH consegue una sostanziale riduzione della generazione di O<sub>2</sub><sup>-</sup><sup>121</sup>. Hyndman et al.<sup>122</sup> hanno persino proposto una diretta sostituzione dell'acido folico alla BH<sub>4</sub> come cofattore per eNOS. Recenti evidenze hanno suggerito che nella NO-sintasi è presente un dominio legante la pteridina simile al sito legante il folato nella diidrofolato reductasi. Questo sito potrebbe agire come un locus attraverso il quale il 5-metil-tetraidrofolato può facilitare il trasferimento di elettroni, attraverso la BH<sub>4</sub> dal dominio reductasico dell'eNOS all'eme<sup>123</sup>. L'acido folico somministrato per il trattamento di pazienti iperomocisteinemicici influenza di fatto non solo i livelli di omocisteinemia, ma anche la concentrazione di marca-

**Tabella IV.** Studi di intervento sulla relazione tra acido folico e funzione endoteliale.

Autori	Anno	Popolazione studiata	Follow-up	Risultati principali
Verhaar et al. <sup>91</sup>	1998	10 pazienti normo-omocisteinici con ipercolesterolemia familiare	15-20 min dopo il trattamento	La supplementazione di acido folico e/o la somministrazione di 5,10 MTHF ristora <i>in vivo</i> la funzione endoteliale
Bellamy et al. <sup>85</sup>	1999	18 adulti sani con iperomocisteinemia media	Al termine di 6 settimane di trattamento	Alte dosi orali di acido folico aumentano le risposte vascolari endotelio-dipendenti
Usui et al. <sup>86</sup>	1999	10 volontari sani con iperomocisteinemia acuta	24 ore	L'aggiunta di acido folico al carico di metionina ne previene la disfunzione endoteliale
Chao et al. <sup>87</sup>	1999	16 volontari sani con iperomocisteinemia acuta	Al termine di 5 settimane di trattamento	L'aggiunta di acido folico al carico di metionina ne previene la disfunzione endoteliale
Verhaar et al. <sup>92</sup>	1999	20 pazienti normo-omocisteinici con ipercolesterolemia familiare	Al termine di 4 settimane di trattamento	La supplementazione di acido folico migliora la funzione endoteliale senza cambiare i lipidi plasmatici
Woo et al. <sup>84</sup>	1999	17 adulti sani asintomatici per iperomocisteinemia relativa	Al termine di 8 settimane di trattamento	La supplementazione di acido folico migliora la funzione endoteliale
Chambers et al. <sup>89</sup>	2000	89 pazienti con malattia coronarica iperomocisteinici	Al termine di 8 settimane di trattamento	La supplementazione con acido folico migliora la funzione endoteliale
Title et al. <sup>88</sup>	2000	75 pazienti con malattia coronarica iperomocisteinici	Al termine di 4 mesi di trattamento	La supplementazione con acido folico migliora significativamente le disfunzioni endoteliali
Vermeulen et al. <sup>94</sup>	2000	78 fratelli sani di pazienti con malattia aterotrombotica prematura	Al termine di 2 anni di trattamento	Il trattamento con acido folico più vitamina B <sub>6</sub> riduce la frequenza di positività all'EKG da sforzo e gli eventi coronarici
Wilmink et al. <sup>93</sup>	2000	20 volontari sani	Al termine di 2 settimane di pre-trattamento	Il pretrattamento con acido folico previene la disfunzione endoteliale e l'aumentata produzione di radicali liberi indotte da un carico acuto di grassi
Miner et al. <sup>41</sup>	2001	12 pazienti trapiantati di cuore	Al termine di 10 settimane di trattamento	La somministrazione di acido folico <i>non</i> migliora la funzione endoteliale
Doshi et al. <sup>90</sup>	2001	52 pazienti con malattia coronarica	Al termine di 6 settimane di trattamento	5 mg/die di acido folico hanno effetti positivi sulla funzione endoteliale con un meccanismo indipendente dalla riduzione dell'omocisteinemia
Doshi et al. <sup>95</sup>	2002	33 pazienti con malattia coronarica	Al termine di 6 settimane di trattamento	Alte dosi di acido folico migliorano la funzione endoteliale con un meccanismo indipendente dall'omocisteina
O'Grady et al. <sup>97</sup>	2002	10 giovani fumatori di sigarette	Al termine di 8 settimane di trattamento	La supplementazione di acido folico migliora la disfunzione endoteliale indotta dal fumo

MTHF = metilene-tetraidrofolato.

tori dello stato ossidativo (aumento di glutazione ridotta, aumento dell'attività enzimatica della superossido dismutasi e glutazione perossidasi), e interferisce anche con la coagulazione (con una riduzione del fibrinogeno e aumenti del plasminogeno e dell'antitrombina III)<sup>124,125</sup>. In tutti questi meccanismi gioca un ruolo fondamentale l'equilibrio tra sintesi di NO e sua inattivazione ad opera delle specie reattive dell'ossigeno<sup>126</sup>.

## Conclusioni

Dai dati raccolti si ricava che i livelli plasmatici di vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>12</sub> e acido folico sono correlati del rischio cardiovascolare, con evidenze sicuramente più forti per vitamina B<sub>6</sub> e acido folico. Queste ultime due vitamine, implicate in maniera importante nel metabolismo dell'omocisteina, hanno tutta una serie di effetti *in vitro* che indicano anche un'azione antiaterogena diretta. I risultati di diversi studi clinici, soprattutto per la vitamina B<sub>6</sub>, supportano un loro ruolo come variabili correlate inversamente al rischio cardiovascolare. La conferma ulteriore di questi dati è importante per poter disegnare future strategie di intervento nella profilassi primaria e secondaria della malattia vascolare aterosclerotica.

## Riassunto

I livelli nutrizionali e le concentrazioni plasmatiche di alcune vitamine del gruppo B, in particolare la vitamina B<sub>6</sub>, la vitamina B<sub>12</sub> e l'acido folico, sono recentemente emersi come correlati inversi del rischio cardiovascolare, e diversi studi sperimentali e clinici, essenzialmente retrospettivi e di tipo caso-controllo, indicano il difetto di tali vitamine come capace di promuovere la progressione della malattia vascolare aterosclerotica. Poiché tutte queste vitamine sono implicate nel metabolismo dell'omocisteina, e questa ha una relazione ben accertata con il rischio cardiovascolare, l'ipotesi più semplice della relazione tra vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>12</sub> e acido folico da una parte, e rischio cardiovascolare dall'altra, è che essa passi attraverso i livelli plasmatici di omocisteina. I dati della letteratura più convincenti per l'esistenza di una relazione con il rischio cardiovascolare sono per vitamina B<sub>6</sub> e acido folico. Queste vitamine hanno tutta una serie di effetti *in vitro* che indicano anche un'azione antiaterogena diretta, ed i risultati di diversi studi clinici, soprattutto per la vitamina B<sub>6</sub>, indicano una relazione inversa con il rischio cardiovascolare almeno in parte indipendente dall'omocisteinemia. La conferma ulteriore di questi dati è importante per poter disegnare future strategie di intervento nella profilassi primaria e secondaria della malattia vascolare aterosclerotica.

**Parole chiave:** Acido folico; Aterosclerosi; Omocisteina; Rischio cardiovascolare; Vitamine.

## Bibliografia

1. Vitamin B<sub>6</sub> (pyridoxine and pyridoxal 5'-phosphate) - monograph. *Altern Med Rev* 2001; 6: 87-92.
2. Gregory JF 3rd, Kirk JR. The bioavailability of vitamin B<sub>6</sub> in foods. *Nutr Rev* 1981; 39: 1-8.
3. Jansonius JN. Structure, evolution and action of vitamin B<sub>6</sub>-dependent enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8: 759-69.
4. Wilson RG, Davis RE. Clinical chemistry of vitamin B<sub>6</sub>. *Adv Clin Chem* 1983; 23: 1-68.
5. Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab* 2000; 71: 121-38.
6. Donnelly JG. Folic acid. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001; 38: 183-223.
7. Rampersaud GC, Kauwell GP, Bailey LB. Folate: a key to optimizing health and reducing disease risk in the elderly. *J Am Coll Nutr* 2003; 22: 1-8.
8. Scott JM. Folate and vitamin B<sub>12</sub>. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 441-8.
9. Markle HV. Cobalamin. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996; 33: 247-356.
10. Martens JH, Barg H, Warren MJ, Jahn D. Microbial production of vitamin B<sub>12</sub>. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 58: 275-85.
11. Herbert V. Vitamin B<sub>12</sub>: plant sources, requirements, and assay. *Am J Clin Nutr* 1988; 48: 852-8.
12. Banerjee R, Ragsdale SW. The many faces of vitamin B<sub>12</sub>: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 2003; 72: 209-47.
13. Scott J, Weir D. Folate/vitamin B<sub>12</sub> inter-relationships. *Essays Biochem* 1994; 28: 63-72.
14. Andreotti F, Burzotta F, Mazza A, Manzoli A, Robinson K, Maseri A. Homocysteine and arterial occlusive disease: a concise review. *Cardiologia* 1999; 44: 341-5.
15. Cole DE. Homocysteine as a risk factor in cardiovascular disease. *Adv Exp Med Biol* 2001; 498: 59-64.
16. Mangoni AA, Jackson SH. Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects. *Am J Med* 2002; 112: 556-65.
17. Graham IM, O'Callaghan P. Vitamins, homocysteine and cardiovascular risk. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16: 383-9.
18. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270: 2693-8.
19. Verhoef P, Kok FJ, Kruyssen DA, et al. Plasma total homocysteine, B vitamins, and risk of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 989-95.
20. 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; 98: 204-10.
21. Siri PW, Verhoef P, Kok FJ. Vitamins B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, and folate: association with plasma total homocysteine and risk of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Nutr* 1998; 17: 435-41.
22. Hung J, Beilby JP, Knuiman MW, Divitini M. Folate and vitamin B<sub>12</sub> and risk of fatal cardiovascular disease: cohort study from Busselton, Western Australia. *BMJ* 2003; 326: 131.
23. Liem A, Reynierse-Buitenwerf GH, Zwinderman AH, Jukema JW, van Veldhuisen DJ. Secondary prevention with folic acid: effects on clinical outcomes. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 2105-13.
24. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-28.

25. Zhou J, Moller J, Ritskes-Hoitinga M, Larsen ML, Austin RC, Falk E. Effects of vitamin supplementation and hyperhomocysteinemia on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 2003; 168: 255-62.
26. Rinehart J, Greenberg L. Arteriosclerotic lesions in pyridoxine-deficient monkeys. *Am J Pathol* 1949; 25: 481-91.
27. Ellis JM, McCully KS. Prevention of myocardial infarction by vitamin B<sub>6</sub>. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1995; 89: 208-20.
28. Franzblau A, Rock CL, Werner RA, Albers JW. Vitamin B<sub>6</sub>, vitamin C, and carpal tunnel syndrome. *J Occup Environ Med* 1998; 40: 305-9.
29. Holm G, Moody LE. Carpal tunnel syndrome: current theory, treatment, and the use of B<sub>6</sub>. *J Am Acad Nurse Pract* 2003; 15: 18-22.
30. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, et al. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med* 1995; 332: 286-91.
31. Serfontein WJ, Ubbink JB, De Villiers LS, Rapley CH, Becker PJ. Plasma pyridoxal-5-phosphate level as risk index for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1985; 55: 357-61.
32. Kok FJ, Schrijver J, Hofman A, et al. Low vitamin B<sub>6</sub> status in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1989; 63: 513-6.
33. Robinson K, Mayer EL, Miller DP, et al. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1995; 92: 2825-30.
34. 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.
35. Robinson K, Arheart K, Refsum H, et al. Low circulating folate and vitamin B<sub>6</sub> concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation* 1998; 97: 437-43.
36. Verhoef P, Meleady R, Daly LE, Graham IM, Robinson K, Boers GH. Homocysteine, vitamin status and risk of vascular disease; effects of gender and menopausal status. European COMAC Group. *Eur Heart J* 1999; 20: 1234-44.
37. Cattaneo M, Lombardi R, Lecchi A, Bucciarelli P, Mannucci PM. Low plasma levels of vitamin B<sub>6</sub> are independently associated with a heightened risk of deep-vein thrombosis. *Circulation* 2001; 104: 2442-6.
38. Nahlawi M, Seshadri N, Boparai N, et al. Usefulness of plasma vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, folate, homocysteine, and creatinine in predicting outcomes in heart transplant recipients. *Am J Cardiol* 2002; 89: 834-7.
39. Chasan-Taber L, Selhub J, Rosenberg IH, et al. A prospective study of folate and vitamin B<sub>6</sub> and risk of myocardial infarction in US physicians. *J Am Coll Nutr* 1996; 15: 136-43.
40. Rimm EB, Willett WC, Hu FB, et al. Folate and vitamin B<sub>6</sub> from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 1998; 279: 359-64.
41. Miner SE, Cole DE, Evrosvki J, et al. Pyridoxine improves endothelial function in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20: 964-9.
42. Wilcken DE, Wilcken B. The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effects of treatment. *J Inher Metab Dis* 1997; 20: 295-300.
43. Boers G, Yap S, Naughten E, Wilcken B. The treatment of high homocysteine concentrations in homocystinuria. Biochemical control in patients and their vascular outcomes. In: Robinson K, ed. *Homocysteine and vascular disease*. Dordrecht, Boston: Kluwer, 2000: 360-89.
44. Levene CI, Murray JC. The aetiological role of maternal vitamin-B<sub>6</sub> deficiency in the development of atherosclerosis. *Lancet* 1977; 1: 628-30.
45. Chan SJ, Chang CN, Hsu JC, Lee YS, Shen CH. Homocysteine, vitamin B<sub>6</sub>, and lipid in cardiovascular disease. *Nutrition* 2002; 18: 595-8.
46. Is vitamin B<sub>6</sub> an antithrombotic agent? *Lancet* 1981; 1: 1299-300.
47. Subbardo K, Kuchibhotla J, Kakkar VV. Pyridoxal 5'-phosphate - a new physiological inhibitor of blood coagulation and platelet function. *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 531-4.
48. Brattstrom L, Stavenow L, Galvard H, et al. Pyridoxine reduces cholesterol and low-density lipoprotein and increases antithrombin III activity in 80-year-old men with low plasma pyridoxal 5-phosphate. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50: 873-7.
49. van Wyk V, Luus HG, Heyns AD. The in vivo effect in humans of pyridoxal-5'-phosphate on platelet function and blood coagulation. *Thromb Res* 1992; 66: 657-68.
50. Roubenoff R, Dellaripa P, Nadeau MR, et al. Abnormal homocysteine metabolism in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 718-22.
51. Friso S, Jacques PF, Wilson PW, Rosenberg IH, Selhub J. Low circulating vitamin B<sub>6</sub> is associated with elevation of the inflammation marker C-reactive protein independently of plasma homocysteine levels. *Circulation* 2001; 103: 2788-91.
52. Brattstrom L, Israelsson B, Lindgarde F, Hultberg B. Higher total plasma homocysteine in vitamin B<sub>12</sub> deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Metabolism* 1988; 37: 175-8.
53. Willems FF, Aengevaeren WR, Boers GH, Blom HJ, Verheugt FW. Coronary endothelial function in hyperhomocysteinemia: improvement after treatment with folic acid and cobalamin in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 766-72.
54. Quinlivan EP, McPartlin J, McNulty H, et al. Importance of both folic acid and vitamin B<sub>12</sub> in reduction of risk of vascular disease. *Lancet* 2002; 359: 227-8.
55. de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Nadeau M, Trijbels FJ, Kromhout D. Coronary heart disease mortality, plasma homocysteine, and B-vitamins: a prospective study. *Atherosclerosis* 2003; 166: 369-77.
56. Kang SS, Passen EL, Ruggie N, Wong PW, Sora H. Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1993; 88: 1463-9.
57. Morita H, Taguchi J, Kurihara H, et al. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 1997; 95: 2032-6.
58. Pancharuniti N, Lewis CA, Sauberlich HE, et al. Plasma homocyst(e)ine, folate, and vitamin B<sub>12</sub> concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 940-8.
59. Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE, et al. Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, and folate. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 845-59.
60. Schwartz SM, Siscovick DS, Malinow MR, et al. Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Circulation* 1997; 96: 412-7.
61. Bunout D, Petermann M, Hirsch S, et al. Low serum folate but normal homocysteine levels in patients with atherosclerotic vascular disease and matched healthy controls. *Nutrition* 2000; 16: 434-8.
62. Morrison HI, Schaubel D, Desmeules M, Wigle DT. Serum folate and risk of fatal coronary heart disease. *JAMA* 1996; 275: 1893-6.
63. Giles WH, Kittner SJ, Croft JB, Anda RF, Casper ML, Ford ES. Serum folate and risk for coronary heart disease: results

- from a cohort of US adults. *Ann Epidemiol* 1998; 8: 490-6.
64. Loria CM, Ingram DD, Feldman JJ, Wright JD, Madans JH. Serum folate and cardiovascular disease mortality among US men and women. *Arch Intern Med* 2000; 160: 3258-62.
  65. Voutilainen S, Lakka TA, Porkkala-Sarataho E, Rissanen T, Kaplan GA, Salonen JT. Low serum folate concentrations are associated with an excess incidence of acute coronary events: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54: 424-8.
  66. Voutilainen S, Rissanen TH, Virtanen J, Lakka TA, Salonen JT. Low dietary folate intake is associated with an excess incidence of acute coronary events: The Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study. *Circulation* 2001; 103: 2674-80.
  67. Dalery K, Lussier-Cacan S, Selhub J, Davignon J, Latour Y, Genest J Jr. Homocysteine and coronary artery disease in French Canadian subjects: relation with vitamins B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, pyridoxal phosphate, and folate. *Am J Cardiol* 1995; 75: 1107-11.
  68. Zeitlin A, Frishman WH, Chang CJ. The association of vitamin B<sub>12</sub> and folate blood levels with mortality and cardiovascular morbidity incidence in the old old: the Bronx aging study. *Am J Ther* 1997; 4: 275-81.
  69. Landewe RB, van den Borne BE, Breedveld FC, Dijkmans BA. Methotrexate effects in patients with rheumatoid arthritis with cardiovascular comorbidity. *Lancet* 2000; 355: 1616-7.
  70. 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.
  71. Kluijtmans LA, Kastelein JJ, Lindemans J, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1997; 96: 2573-7.
  72. Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996; 94: 2410-6.
  73. Schmitz C, Lindpaintner K, Verhoef P, Gaziano JM, Buring J. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and myocardial infarction. A case-control study. *Circulation* 1996; 94: 1812-4.
  74. Anderson JL, King GJ, Thomson MJ, et al. A mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with increased risk for coronary artery disease or myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 1206-11.
  75. Verhoef P, Rimm EB, Hunter DJ, et al. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and risk of coronary heart disease: results among US men. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 353-9.
  76. Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 1998; 98: 2520-6.
  77. Silberberg JS, Crooks RL, Wlodarczyk JH, Fryer JL. Association between plasma folate and coronary disease independent of homocysteine. *Am J Cardiol* 2001; 87: 1003-4.
  78. Hernandez-Diaz S, Martinez-Losa E, Fernandez-Jarne E, Serrano-Martinez M, Martinez-Gonzalez MA. Dietary folate and the risk of nonfatal myocardial infarction. *Epidemiology* 2002; 13: 700-6.
  79. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1990; 81: 491-7.
  80. Zeiher AM, Krause T, Schachinger V, Minners J, Moser E. Impaired endothelium-dependent vasodilation of coronary resistance vessels is associated with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation* 1995; 91: 2345-52.
  81. Hasdai D, Gibbons RJ, Holmes DR Jr, Higano ST, Lerman A. Coronary endothelial dysfunction in humans is associated with myocardial perfusion defects. *Circulation* 1997; 96: 3390-5.
  82. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000; 101: 948-54.
  83. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 1899-906.
  84. Woo KS, Chook P, Lolin YI, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS. Folic acid improves arterial endothelial function in adults with hyperhomocysteinemia. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 2002-6.
  85. Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW, Brownlee M, Newcombe RG, Lewis MJ. Oral folate enhances endothelial function in hyperhomocysteinemic subjects. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 659-62.
  86. Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endothelial dysfunction by acute hyperhomocyst(e)inaemia: restoration by folic acid. *Clin Sci (Lond)* 1999; 96: 235-9.
  87. Chao CL, Chien KL, Lee YT. Effect of short-term vitamin (folic acid, vitamins B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub>) administration on endothelial dysfunction induced by post-methionine load hyperhomocysteinemia. *Am J Cardiol* 1999; 84: 1359-61.
  88. Title LM, Cummings PM, Giddens K, Genest JJ Jr, Nassar BA. Effect of folic acid and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 758-65.
  89. Chambers JC, Ueland PM, Obeid OA, Wrigley J, Refsum H, Kooner JS. Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: an effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine. *Circulation* 2000; 102: 2479-83.
  90. Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, et al. Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1196-202.
  91. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Dam T, Koomans HA, Rabelink TJ. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 97: 237-41.
  92. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, et al. Effects of oral folic acid supplementation on endothelial function in familial hypercholesterolemia. A randomized placebo-controlled trial. *Circulation* 1999; 100: 335-8.
  93. Wilmink HW, Stroes ES, Erkelens WD, et al. Influence of folic acid on postprandial endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 185-8.
  94. Vermeulen EG, Stehouwer CD, Twisk JW, et al. Effect of homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B<sub>6</sub> on progression of subclinical atherosclerosis: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 355: 517-22.
  95. Doshi SN, McDowell IF, 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.
  96. Mangoni AA, Sherwood RA, Swift CG, Jackson SH. Folic acid enhances endothelial function and reduces blood pressure in smokers: a randomized controlled trial. *J Intern Med* 2002; 252: 497-503.
  97. O'Grady HL, Leahy A, McCormick PH, Fitzgerald P, Kelly CK, Bouchier-Hayes DJ. Oral folic acid improves endothelial dysfunction in cigarette smokers. *J Surg Res* 2002; 106: 342-5.
  98. Stroes ES, van Faassen EE, Yo M, et al. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 2000; 86: 1129-34.

99. Das UN. Folic acid says NO to vascular diseases. *Nutrition* 2003; 19: 686-92.
100. Kaufman S. Some metabolic relationships between bipterin and folate: implications for the "methyl trap hypothesis". *Neurochem Res* 1991; 16: 1031-6.
101. Gori T, Burstein JM, Ahmed S, et al. Folic acid prevents nitroglycerin-induced nitric oxide synthase dysfunction and nitrate tolerance: a human in vivo study. *Circulation* 2001; 104: 1119-23.
102. Pita ML, Delgado MJ. Folate administration increases n-3 polyunsaturated fatty acids in rat plasma and tissue lipids. *Thromb Haemost* 2000; 84: 420-3.
103. Schmidt K, Werner ER, Mayer B, Wachter H, Kukovetz WR. Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells. *Biochem J* 1992; 281 (Part 2): 297-300.
104. Cosentino F, Katusic ZS. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation* 1995; 91: 139-44.
105. Mayer B, Werner ER. In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995; 351: 453-63.
106. Cai S, Alp NJ, McDonald D, et al. GTP cyclohydrolase I gene transfer augments intracellular tetrahydrobiopterin in human endothelial cells: effects on nitric oxide synthase activity, protein levels and dimerisation. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 838-49.
107. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 217-30.
108. Witteveen CF, Giovanelli J, Kaufman S. Reduction of quinonoid dihydrobiopterin to tetrahydrobiopterin by nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1996; 271: 4143-7.
109. Kwon NS, Nathan CF, Stuehr DJ. Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J Biol Chem* 1989; 264: 20496-501.
110. Werner ER, Werner-Felmayer G, Wachter H, Mayer B. Biosynthesis of nitric oxide: dependence on pteridine metabolism. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1996; 127: 97-135.
111. Reif A, Frohlich LG, Kotsonis P, et al. Tetrahydrobiopterin inhibits monomerization and is consumed during catalysis in neuronal NO synthase. *J Biol Chem* 1999; 274: 24921-9.
112. Kumar KV, Das UN. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commun* 1993; 19: 59-66.
113. Gross SS, Levi R. Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 1992; 267: 25722-9.
114. Tzeng E, Billiar TR, Robbins PD, Loftus M, Stuehr DJ. Expression of human inducible nitric oxide synthase in a tetrahydrobiopterin (H4B)-deficient cell line: H4B promotes assembly of enzyme subunits into an active dimer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11771-5.
115. Laursen JB, Somers M, Kurz S, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001; 103: 1282-8.
116. Meininger CJ, Marinos RS, Hatakeyama K, et al. Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem J* 2000; 349: 353-6.
117. Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, et al. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. *Circ Res* 2000; 87: 566-73.
118. Hink U, Li H, Mollnau H, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001; 88: E14-E22.
119. Lang D, Kredan MB, Moat SJ, et al. Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 422-7.
120. Matthews RG, Kaufman S. Characterization of the dihydropterin reductase activity of pig liver methylenetetrahydrofolate reductase. *J Biol Chem* 1980; 255: 6014-7.
121. Loscalzo J. Folate and nitrate-induced endothelial dysfunction: a simple treatment for a complex pathobiology. *Circulation* 2001; 104: 1086-8.
122. Hyndman ME, Verma S, Rosenfeld RJ, Anderson TJ, Parsons HG. Interaction of 5-methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin on endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H2167-H2172.
123. Mayer B, Pitters E, Pfeiffer S, Kukovetz WR, Schmidt K. A synthetic peptide corresponding to the putative dihydrofolate reductase domain of nitric oxide synthase inhibits uncoupled NADPH oxidation. *Nitric Oxide* 1997; 1: 50-5.
124. Mayer O, Filipovsky J, Hromadka M, et al. Treatment of hyperhomocysteinemia with folic acid: effects on homocysteine levels, coagulation status, and oxidative stress markers. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 39: 851-7.
125. Mayer O Jr, Simon J, Rosolova H, Hromadka M, Subrt I, Vobrubova I. The effects of folate supplementation on some coagulation parameters and oxidative status surrogates. *Eur J Clin Pharmacol* 2002; 58: 1-5.
126. Hare JM. Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *N Engl J Med* 2004; 351: 2112-4.