

## Iperomocisteinemia e rischio cardiovascolare: stato dell'arte

Paola Pezzati<sup>1</sup>, Fiamma Balboni<sup>2</sup>, Maria Stella Graziani<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Diagnostica di Laboratorio, Laboratorio Generale, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

<sup>2</sup>Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Istituto Fiorentino di Cura e Assistenza, Firenze

<sup>3</sup>Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore, Azienda Ospedaliera-Universitaria Integrata di Verona

### ABSTRACT

**Hyperhomocysteinemia and cardiovascular risk: state of the art.** Several decades ago it was suggested that individuals with elevated concentrations of plasma homocysteine, a sulphur-containing amino acid, have an increased risk of coronary heart disease. Observational studies confirmed the association, although its strength has recently been reconsidered. Whether this association is causal is still uncertain; however, it is highly relevant to answer the clinical question if treatments with B-type vitamins and folate, known to lower plasma homocysteine concentrations, may reduce vascular risk. The present paper reviews the evidence in a historical perspective, from observational studies to randomized controlled trials. Results from recent meta-analyses are also presented and discussed. Laboratory professionals should be aware that, although "homocysteine lowering" trials showed no effects on vascular outcomes, the measurement of plasma homocysteine concentrations is still of some value as diagnostic (homocysteinuria, vitamin B deficiencies) and prognostic (cardiovascular disease) tool.

### INTRODUZIONE

L'omocisteina (Hcy) è un amminotio a quattro atomi di carbonio derivato dalla demetilazione della metionina, amminoacido solforato essenziale, abbondante nelle proteine animali; organi di sintesi sono il fegato e il muscolo striato, nei quali si forma durante la biosintesi della creatina (1). La sua funzione biologica si esplica attraverso due reazioni enzimatiche: la rimetilazione e la transulfurazione (2). Per la prima è richiesta la presenza di due coenzimi, folato e metilcobalamina; per la seconda della vitamina B6.

La rimetilazione è favorita da condizioni di carenza di metionina; in tal caso Hcy viene riciclata a metionina secondo due vie differenti. La prima richiede la presenza dell'enzima metionina sintasi (MS), di vitamina B12 e N-metiltetraidrofolato (MTHF). La seconda invece, che è presente soprattutto a livello epatico, è vitamina B12-indipendente e richiede la presenza di betaina-omocisteina metiltransferasi, in quanto utilizza la betaina come donatore di gruppi metile.

La transulfurazione invece avviene quando la via della rimetilazione è satura o quando è necessario produrre cisteina. In questa reazione Hcy si condensa con la serina per formare cistationina in un processo irreversibile catalizzato dall'enzima cistationina  $\beta$ -sintetasi, che richiede vitamina B6 come coenzima. La cistationina viene idrolizzata a  $\gamma$ -chetobutirrato e cisteina, il cui eccesso viene ossidato a taurina e solfati organici poi escreti nelle urine. Pertanto, questa via metabolica non solo porta alla produzione di cisteina, ma catabolizza effettivamente l'eccesso di Hcy non richiesto per il trasferimento di metile e fornisce solfato utile in altre vie metaboliche.

La forma circolante (Hcy totale) è la somma di tutti i tipi molecolari plasmatici (Hcy libera, Hcy legata alle proteine, disolfuri misti e Hcy-tiolattone) (3) e riflette il bilancio fra produzione e utilizzo; tuttavia, molti fattori sono in grado di provocare un'iperomocisteinemia: carenza di vitamine B (come accennato, le vitamine B6, B12 e l'acido folico sono necessari per gli enzimi coinvolti nelle vie metaboliche e le loro carenze nutrizionali provocano blocchi con conseguente aumento dei prodotti intermedi); carenze enzimatiche su base genetica (sono noti difetti dei geni che codificano per gli enzimi MTHF riduttasi e MS); insufficienza renale, con conseguente diminuzione della "clearance" della Hcy; farmaci (terapie con ciclosporina A o metotressato); età (all'aumento dell'età corrisponde un aumento della Hcy plasmatica); sesso (gli uomini hanno valori più alti delle donne); stile di vita (attività fisica, fumo, stress, assunzione di caffè) e condizioni generali di salute (i soggetti in buono stato di salute presentano concentrazioni di Hcy inferiori rispetto ai soggetti in peggior stato di salute) (4, 5). Da un punto di vista epidemiologico, la carenza nutrizionale è la causa più frequente di alterazione del metabolismo della metionina con conseguente iperomocisteinemia; per tale motivo le concentrazioni plasmatiche di Hcy sono considerate un sensibile indicatore di deficit delle vitamine correlate (folato, B12 e B6) (6).

### METODI DI DETERMINAZIONE

Il campione biologico di elezione per la determinazione della Hcy è quello raccolto con EDTA o eparina. Non è raccomandabile l'uso del citrato come anticoagulante in quanto esso implica risultati del 5-10%

più bassi (7). Tuttavia, il tipo di anticoagulante deve essere scelto in base al metodo analitico adottato dal laboratorio, poiché esistono interferenze metodo-dipendenti.

Il campione deve essere refrigerato immediatamente dopo il prelievo e centrifugato entro 30 min per evitare un aumento di Hcy dovuto alla cessione del tiolo da parte dei globuli rossi, quantificabile in circa 1  $\mu\text{mol/L}$  all'ora a temperatura ambiente. L'emolisi può interferire con alcuni metodi di misurazione, ma di per sé non è responsabile di innalzamento della omocisteinemia. Dopo centrifugazione e separazione, il campione ha ottima stabilità: può essere conservato 4 giorni a temperatura ambiente, per settimane a +4 °C e svariati anni a -20 °C. L'uso di provette con gel separatore facilita la gestione dei campioni, poiché la concentrazione della Hcy resta stabile, dopo centrifugazione, per 48 ore a temperatura ambiente (7, 8).

Per la determinazione a scopo clinico della Hcy plasmatica non è necessaria una specifica preparazione del paziente e sono sufficienti le procedure adottate routinariamente dai centri prelievi.

Per identificare i soggetti con un parziale deficit del metabolismo della Hcy, nei quali le concentrazioni basali sono nei limiti fisiologici, può essere eseguita la prova da carico di metionina, in cui sono somministrati 100 mg di metionina ed eseguiti prelievi ematici per la misurazione della Hcy dopo 4-6 ore oppure dopo 2 ore, in base al protocollo adottato. I risultati devono essere interpretati in base al sesso, all'età del soggetto e alle condizioni generali; a scopo indicativo, la concentrazione dopo carico negli adulti può essere al massimo 5 volte superiore al livello basale. L'utilità clinica della prova da carico è tuttavia controversa.

I primi metodi analitici per la determinazione della Hcy sono stati introdotti a metà degli anni '80; tutti prevedono una tappa di conversione delle forme circolanti di Hcy nella forma ridotta e sono riconducibili a principi analitici cromatografici o immunometrici (Tabella 1). Questi ultimi hanno il vantaggio di essere di facile esecuzione, rapidi e relativamente economici. I metodi cromatografici (HPLC con rilevatore UV, a fluorescenza

o elettrochimico), l'elettroforesi capillare con rilevazione in fluorescenza, la gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) e la cromatografia liquida con spettrometria di massa-tandem (LC-MS-MS) presentano il vantaggio di avere un ampio intervallo di misurazione, di determinare simultaneamente anche altri composti (amminoacidi solforati, acido metilmalonico) e spesso di avere anche un costo/esame ridotto; tra gli svantaggi, deve essere ricordata la bassa cadenza analitica, il discreto investimento di risorse in termini di tempo e personale e la necessità di competenze specifiche.

Esiste notevole variabilità interlaboratorio e tra metodi, che rendono difficile confrontare i risultati provenienti da laboratori diversi (9). Un gruppo internazionale di esperti ha raccomandato che il bias accettabile sia <10% e che l'imprecisione (CV) sia <5% (10).

Per quanto riguarda gli intervalli di riferimento, anche per la Hcy vale la raccomandazione della elaborazione, a cura di ogni centro che esegua l'analisi, dei propri intervalli di riferimento, compito reso in questo caso ancora più complesso a causa delle molte variabili (età, sesso, etnia, gravidanza, menopausa, fumo, stato nutrizionale, funzionalità renale, uso di farmaci, fortificazione dei cibi con acido folico) che ne influenzano in modo significativo le concentrazioni circolanti. A scopo indicativo, negli adulti l'intervallo di riferimento è compreso tra 6 e 10  $\mu\text{mol/L}$ ; se il soggetto vive in una nazione in cui è stata introdotta per legge la fortificazione delle farine alimentari con acido folico, l'intervallo si abbassa del 10-30%.

Un documento di consenso pubblicato nel 2003 ha definito l'iperomocisteinemia, classificandola in base alle concentrazioni plasmatiche, come moderata (Hcy pari a 15-30  $\mu\text{mol/L}$ ), intermedia (30-100  $\mu\text{mol/L}$ ) e severa (>100  $\mu\text{mol/L}$ ) (11). Tuttavia, l'interpretazione delle concentrazioni di Hcy nel singolo individuo deve sempre essere contestualizzata, valutando il peso delle citate variabili.

La variabilità intraindividuo (definita come somma della variabilità biologica e di quella analitica ed espressa come CV intra-individuo) è pari al 8% (12). Tale variazione sarebbe quindi simile a quella della

**Tabella 1**

*Sistemi analitici disponibili per la determinazione della omocisteina del plasma*

Ditta	Metodo	Strumentazione
Abbott Diagnostics	Immunoenzimatico con fluorescenza a luce polarizzata (FPIA)	IMx, AxSYM
Alpco Diagnostics	HPLC	Cromatografo
Axis Shield Diagnostics	"Enzyme-linked immunoassay" (EIA)	Manuale
Axis Shield Diagnostics	Immunonefelometrico	Nefelometri Siemens BN
Bio-Rad Laboratories	HPLC	Cromatografo
Chromsystems	HPLC	Cromatografo
Diazyme	Enzimatico	Roche Cobas Integra e c501
Instrumentation Laboratory	Agglutinazione al latex	Sistemi ACL
Siemens Health Care Diagnostics	Immunoenzimatico in chemiluminescenza	ADVIA Centaur XP, ADVIA Centaur CP, VISTA, Immulite 2000

colesterolemia totale e non dovrebbe costituire un problema nell'ambito dei lunghi "follow-up"; tuttavia, nelle situazioni di iperomocisteinemia si riscontrano variazioni intraindividuali maggiori: in soggetti con valori di 40  $\mu\text{mol/L}$ , la variabilità è di circa il 5% dopo 4-8 mesi e di circa il 35% dopo due anni. Tale dato è di estrema importanza quando si debbano interpretare i risultati di "trials" condotti su soggetti con elevate concentrazioni basali di Hcy, poiché l'oscillazione dei valori deve essere riconosciuta come un potenziale fattore confondente e come tale deve essere valutata.

Attualmente la determinazione della Hcy plasmatica può avere tre indicazioni cliniche:

1. diagnosi di omocistinuria;
2. identificazione dei soggetti con carenze nutrizionali di vitamina B6, B12 e folati;
3. valutazione della omocisteinemia come fattore di rischio cardiovascolare in soggetti con familiarità per aterosclerosi precoce, in presenza o assenza di fattori di rischio convenzionali (obesità, sedentarietà, ipertensione, fumo, dislipidemia).

### OMOCISTEINEMIA E RISCHIO CARDIOVASCOLARE

La patologie cardiovascolari sono, sia nei paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo, un'importante causa di mortalità e morbidità, con enormi costi per la società in termini di consumo di risorse materiali ed umane (13). La prevenzione primaria e secondaria di tali condizioni morbose, attuabile con il riconoscimento e la modifica dei fattori di rischio, è unanimemente considerata una strategia vantaggiosa per il singolo individuo e per la comunità. Da molti anni, alla lista dei più noti fattori di rischio per patologie cardiovascolari e cerebrovascolari, quali fumo, ipertensione, obesità, dislipidemie, si è aggiunta l'iperomocisteinemia.

I paragrafi seguenti ripercorrono le tappe che hanno portato alla produzione, lettura critica e reinterpretazione delle evidenze relative alla verifica del ruolo della Hcy in tale ambito e agli studi di intervento tendenti a ridurre le concentrazioni circolanti. Gli studi indirizzati a chiarire il ruolo dell'iperomocisteinemia come fattore di rischio cardiovascolare individuano, infatti, un percorso di estremo interesse, sia dal punto di vista metodologico, poiché esemplificano alcuni delle criticità presenti nella metodologia della ricerca scientifica, sia da un punto di vista più generale, poiché mettono in luce quanto possa essere produttivo far convergere gli sforzi di vari gruppi di studio, interessati al medesimo quesito clinico, per ottenere evidenze solide e raccomandazioni forti.

Il ruolo della Hcy nella patogenesi delle malattie cardiovascolari è stato ipotizzato fin dal 1969 quando McCully osservò al tavolo autoptico la presenza di aterosclerosi prematura diffusa in due bambini affetti da omocistinuria, patologia ereditaria congenita, e formulò l'ipotesi di un rapporto diretto tra esposizione ad elevate concentrazioni di Hcy e lesioni aterosclerotiche diffuse e fenomeni di tromboembolismo arterioso e venoso (14).

Queste prime osservazioni hanno indirizzato, a partire dalla fine degli anni '80, la ricerca di base e la ricerca clinica verso la formulazione della "ipotesi omocisteina" nel contesto dei fenomeni di generazione dell'aterosclerosi e quindi verso l'inquadramento della iperomocisteinemia come fattore di rischio della malattia cardiovascolare e cerebrovascolare (15).

Il meccanismo esatto tramite il quale Hcy provoca l'aterosclerosi non è stato ancora chiarito; tuttavia, la ricerca di base ha messo in luce una serie di eventi che possono, di per sé o in sinergia fra loro, contribuire alla patogenesi della lesione (16). Studi sui meccanismi biochimici relativi alla funzione dell'endotelio hanno evidenziato che Hcy è in grado di compromettere la normale funzione endoteliale riducendo, da un lato, la sintesi di monossido di azoto, che è la più potente molecola ad azione vasodilatatoria prodotta dall'endotelio e dall'altro aumentando lo stress ossidativo (17). Nell'iperomocisteinemia si verifica, infatti, un incremento nella produzione di specie reattive dell'ossigeno, anche tramite il coinvolgimento dell'ossidnitrico sintasi endoteliale, ed un'inibizione degli enzimi antiossidanti cellulari, come la superossido dismutasi e l'isoforma cellulare della glutatione perossidasi (18). A carico dell'endotelio è stato inoltre segnalato un aumento della proliferazione delle cellule muscolari lisce indotto da alte concentrazioni circolanti di Hcy, parallelamente ad una interferenza con la normale funzione piastrinica, fenomeni che possono contribuire all'instaurarsi della placca aterosclerotica (19).

Esiste quindi un coinvolgimento importante della Hcy negli eventi fisiopatologici che determinano la malattia aterosclerotica. Coerentemente con le prime osservazioni di McCully, la ricerca clinica, basata su studi epidemiologici illustrati più avanti, ha confermato che elevate concentrazioni di Hcy sono associate alla presenza o allo sviluppo di eventi ischemici cardiovascolari.

Il fattore di rischio "iperomocisteinemia" può essere, tuttavia, facilmente controllato (ovvero possono essere abbassate le concentrazioni plasmatiche di Hcy) con la semplice supplementazione alimentare di acido folico e vitamine B (20, 21). Come conseguenza del controllo sul fattore di rischio si dovrebbe assistere ad una riduzione dei fenomeni aterosclerotici indotti dalla Hcy, cioè una riduzione dell'incidenza delle patologie cardiovascolari e cerebrovascolari di tipo ischemico e trombotico. Questo è il razionale che ha ispirato ed ispira gli studi di intervento in questo campo; tuttavia, la definitiva verifica di quest'ultima ipotesi, che si è articolata ormai per alcuni decenni, si è dimostrata ardua ed ha visto la produzione di evidenze, la cui qualità è stata via via sottoposta a riletture critiche che, se da un lato ne hanno chiarito le limitazioni metodologiche e hanno indirizzato gli studi successivi, dall'altro hanno prodotto un vivace dibattito nella comunità scientifica e un'alternanza di notizie contrastanti per i non addetti ai lavori.

Sebbene alcuni grandi "trials" siano ancora in corso e quindi, a rigore, una risposta definitiva possa essere data solo alla loro conclusione, si può affermare che, ad oggi, non ci sono evidenze che indichino una

diminuzione degli eventi cardiovascolari e cerebrovascolari secondariamente al trattamento con acido folico e alla riduzione delle concentrazioni circolanti di Hcy.

Nei successivi paragrafi sono presentate le evidenze prodotte dagli studi osservazionali, che hanno studiato il ruolo della Hcy come fattore di rischio per le patologie vascolari, e le evidenze prodotte dagli studi di intervento, che propongono il trattamento con folati come prevenzione delle stesse.

### Gli studi osservazionali

Negli anni '90, grazie alla presenza in letteratura di un discreto numero di studi caso-controllo di tipo retrospettivo, pubblicati per chiarire la relazione tra iperomocisteinemia e insorgenza di patologia cardiovascolare di tipo ischemico, sono state condotte delle importanti revisioni sistematiche. La prima metanalisi risale al 1995 ed analizza dati di 2297 soggetti derivanti da 27 studi osservazionali (22). Le concentrazioni di Hcy sono misurate in pazienti affetti da patologia coronarica di tipo ischemico (CHD) e l'analisi statistica suggerisce una forte associazione tra concentrazioni di Hcy e sviluppo di patologia. Gli Autori indicano un "odds ratio" (OR) di 1,6 [intervallo di confidenza (IC) 95%: 1,4-1,7] nei soggetti di sesso maschile e un OR di 1,8 (IC 95%: 1,3-1,9) nel sesso femminile, quando esista un innalzamento del valore di omocisteinemia pari a 5  $\mu\text{mol/L}$ . Gli Autori indicano anche un OR di 1,5 (IC 95%: 1,3-1,9) per "stroke", sempre per un aumento di Hcy pari a 5  $\mu\text{mol/L}$ .

I dati apparivano di estremo interesse, data la forza dell'associazione, pari a più del 60% di aumento del rischio di sviluppo di CHD. Tuttavia, tali dati sono stati, in tempi più recenti, sottoposti ad un'analisi critica, che ha evidenziato alcune limitazioni metodologiche (23). Prima fra tutte, il mancato aggiustamento per fattori di confondimento. Le concentrazioni plasmatiche di Hcy sono, infatti, strettamente correlate ad una serie di parametri (età, sesso maschile, obesità e valori di pressione sanguigna), noti come fattori di rischio per patologia cardiovascolare. Il mancato aggiustamento per questi fattori di confondimento porta ad una sovrastima della forza dell'associazione (24). Un ulteriore problema metodologico presente in questi primi lavori è dato dal non aver tenuto presente la variazione intraindividuale delle concentrazioni di Hcy nei lunghi periodi di tempo, fenomeno che introduce un errore sistematico ("regression dilution bias") (25).

Data la potenziale rilevanza in termini di salute pubblica, gli anni immediatamente successivi vedono la pubblicazione di numerosi altri studi osservazionali, tra cui alcuni prospettici, di maggior validità metodologica, analizzati da una revisione sistematica del 1998 (26). Il lavoro esamina separatamente 17 studi retrospettivi e 5 studi prospettici tra i quali sono presenti anche due studi caso-controllo tipo "nested", in cui i controlli sono perfettamente abbinati ai casi. La metanalisi condotta sui 5 studi prospettici (totale 1000 casi) evidenzia, per un

aumento delle concentrazioni plasmatiche della Hcy pari a 5  $\mu\text{mol/L}$ , un OR di 1,3 (IC 95%: 1,1-1,5). Tale associazione appare quindi più debole di quella precedentemente rilevata, sebbene ancora di notevole interesse, rappresentando un aumento del rischio di patologia pari al 30%.

Nel 2002 un contributo al dibattito sul ruolo della Hcy è fornito da una revisione sistematica incentrata su 57 studi (3 studi di coorte, 12 caso-controllo "nested", 42 caso-controllo) per un totale di 5518 soggetti affetti da CHD e 1817 da patologia cerebrovascolare (27). La forza dell'associazione è ulteriormente ridimensionata e per un aumento dell'omocisteinemia pari a 5  $\mu\text{mol/L}$  è segnalato, relativamente alla patologia cardiovascolare, un OR di 1,06 (IC 95%: 0,99-1,13) negli studi coorte, un OR di 1,23 (IC 95%: 1,07-1,41) nei caso-controllo "nested" ed infine un OR di 1,70 (IC 95%: 1,50-1,93) negli studi di tipo caso-controllo. Interessanti anche i dati relativi allo "stroke", poiché ad un aumento dell'omocisteinemia pari a 5  $\mu\text{mol/L}$  corrisponde un OR di 1,10 (IC 95%: 0,94-1,28) negli studi di coorte, un OR di 1,58 (IC 95%: 1,35-1,85) negli studi caso-controllo "nested" e infine un OR di 2,16 (IC 95%: 1,65-2,82) negli studi caso-controllo.

Il disegno di studio, quindi, condiziona pesantemente la forza dell'associazione, che risulta sovrastimata come conseguenza dei "bias". Assumendo come evidenze di maggiore solidità quelle derivanti dagli studi prospettici, l'aumento di rischio di patologia, a fronte di innalzamento del valore di base della Hcy, è stimato pari a circa il 10%. Gli Autori della revisione concludono che, sebbene l'importanza dell'iperomocisteinemia come fattore di rischio per CHD sia stata in passato sovrastimata, come conseguenza delle limitazioni metodologiche degli studi, è tuttavia possibile arrivare ad una corretta interpretazione dell'importanza e del ruolo rivestito dal metabolita, ponendosi due fondamentali obiettivi. Il primo è la definizione di dati epidemiologici corretti, raggiungibile con la stesura di una revisione sistematica basata sui dati dei singoli partecipanti agli studi osservazionali; il secondo obiettivo è la ricerca della risposta al quesito clinico relativo agli effetti della somministrazione di acido folico sulle patologie vascolari, tramite "trials" clinici.

La prima sfida è raccolta nel 2002 grazie all'impegno della "Homocysteine Studies Collaboration", un gruppo di studio responsabile della pubblicazione di una metanalisi (23) che, attingendo ai "database" dei singoli studi osservazionali e quindi ai dati dei singoli partecipanti, realizza una serie di analisi per sottogruppi omogenei e propone correzioni per i fattori di confondimento e per il "regression dilution bias". Gli Autori sono particolarmente interessati agli studi prospettici di coorte, in cui la misurazione della Hcy sia stata eseguita prima dell'insorgenza della patologia cardiovascolare o cerebrale. Sono analizzati anche i lavori retrospettivi, suddivisi in base alla tipologia di controllo adottata (controlli di popolazione o controlli di altro tipo). Il lavoro analizza 30 studi per un totale di 5073 casi di CHD e 1113 casi di "stroke". Negli studi prospettici, un



abbassamento del valore dell'omocisteina plasmatica pari al 25% rispetto del valore di base è associato ad una diminuzione del rischio di CHD del 11% (OR 0,89, IC 95%: 0,83-0,96, aggiustato per sesso, età, fumo, pressione sanguigna sistolica e colesterolemia) e ad una diminuzione del rischio di "stroke" pari al 19% (OR 0,81, IC 95%: 0,69-0,95, aggiustato per sesso, età, fumo, pressione sanguigna sistolica e colesterolemia). Negli studi retrospettivi le associazioni sono più forti, ma gli Autori attribuiscono ciò all'effetto di "bias" non comprimibili.

Questi dati osservazionali, ad oggi i più solidi e controllati dal punto di vista metodologico, ripropongono il concetto che l'associazione esiste anche per differenze di concentrazioni di Hcy relativamente piccole e che tale evidenza sia da considerarsi rilevante in termini di salute pubblica.

### Gli studi di intervento

Una volta definito questo concetto, la valenza della "ipotesi omocisteina", in termini di prevenzione primaria e secondaria, deve emergere da studi clinici che indaghino se una supplementazione con acido folico e vitamine B possa indurre una diminuzione degli eventi ischemici cardiovascolari e cerebrali.

Prima di esaminare in dettaglio i lavori, conclusi o in corso, è necessario premettere che i protocolli dei primi studi di intervento sono stati progettati, come naturali, in base alle evidenze disponibili al momento. Sappiamo oggi che l'associazione tra innalzamento dell'omocisteinemia e patologia ischemica e trombotica era notevolmente sovrastimata. Ciò ha implicato nei primi "trials" un errore nel calcolo della potenza degli stessi (28). Apparentemente, infatti, secondo le prime revisioni la forza dell'associazione stimata era molto grande (60%) ed in tali condizioni è sufficiente una popolazione di bassa numerosità per evidenziare l'efficacia di un trattamento, ma se la forza dell'associazione è minore (circa il 10%, secondo la revisione del 2002) il campione deve essere di grandi dimensioni per rendere visibile una differenza statisticamente significativa. L'errore nel calcolo delle dimensioni degli studi, ovvero del numero di soggetti da reclutare, insieme alla breve durata del "follow-up" (inferiore ai 12 mesi), sono i "bias" che hanno penalizzato i primi "trials" e che hanno portato alla produzione di deboli evidenze.

Il dubbio che i lavori con risultati negativi semplicemente non fossero in grado di rivelare una reale associazione tra terapia e "outcome" ha reso necessaria la conduzione di ulteriori "trials". Ma anche i grandi "trials" pianificati alla fine degli anni '90 hanno sofferto di un problema metodologico, quando, nel 1998, negli Stati Uniti e in Canada è stata introdotta per legge la fortificazione delle farine alimentari con folati. Ciò ha provocato nella popolazione generale, ed anche in quella reclutata negli studi, un abbassamento dei valori di omocisteinemia indipendente dall'eventuale trattamento e probabilmente non comprimibile con una ulteriore somministrazione di vitamine. Per arrivare alla

consapevolezza di tali problemi e del loro effetto sui dati prodotti dai "trials", tuttavia, sono stati necessari anni di lavoro e sono state spese molte energie.

Di seguito sono riportate le informazioni essenziali di alcuni studi di intervento.

### Gli studi conclusi

Fra il 1993 e il 2006 sono stati realizzati 9 grandi "trials" (Tabella 2).

HOST ("Homocysteinemia in kidney and end stage renal disease") è uno studio condotto su reduci di guerra affetti da insufficienza renale cronica e realizzato negli Stati Uniti fra settembre 2001 e ottobre 2003 (29). Sono stati arruolati 2056 pazienti. Le concentrazioni di omocisteinemia sono state misurate dopo tre mesi di terapia e hanno mostrato una riduzione del 25,8%. Il trattamento con folati e vitamine non ha portato alcuna differenza di incidenza di mortalità [hazard ratio (HR) 1,04, IC 95%: 0,91-1,18] o di eventi vascolari maggiori ("stroke": HR 0,90, IC 95%: 0,58-1,40; infarto miocardico acuto: HR 0,86, IC 95%: 0,67-1,08; amputazioni: HR 1,14, IC 95%: 0,79-1,64) fra i gruppi trattamento e placebo. Le conclusioni a cui sono giunti gli Autori sono che "il trattamento con alte dosi di acido folico e vitamine del gruppo B non migliora la sopravvivenza, né riduce l'incidenza di malattie vascolari in pazienti con insufficienza renale cronica in stadio avanzato o terminale" (29).

NORVIT ("Norwegian vitamin") è uno studio realizzato in Norvegia dal dicembre 1998 al marzo 2004 (30). Sono stati sottoposti al trattamento 3749 pazienti con pregresso infarto del miocardio. Il "follow-up" mediano è stato di 40 mesi. L'ipotesi dello studio era che la supplementazione vitaminica, riducendo le concentrazioni sieriche di omocisteina, potesse ridurre il rischio di eventi cardiovascolari recidivanti in pazienti con pregresso infarto del miocardio. La concentrazione media di Hcy è stata ridotta dalla supplementazione vitaminica del 27%, ma non si è avuto nessun effetto significativo sull'"end point" primario, anche se nel gruppo trattato con acido folico, vitamina B12 e B6 c'è stata una tendenza verso un aumento del rischio [rischio relativo (RR) 1,22, IC 95%: 1,00-1,50]. Le conclusioni degli Autori sono state che "il trattamento con vitamine del gruppo B non ha abbassato il rischio di malattia cardiovascolare ricorrente dopo un infarto acuto del miocardio. Tuttavia, si evidenzia un effetto dannoso derivante dall'uso di supplementazione combinata di vitamine del gruppo B; pertanto questo trattamento non è raccomandato" (30).

Può essere qui interessante esaminare un po' più in dettaglio i dati dello studio NORVIT, poiché essi hanno suscitato un acceso dibattito. La conduzione dello studio è stata sottoposta ad una attenta lettura critica, che ha evidenziato una serie di "bias" relativi a criteri di arruolamento (la valutazione delle concentrazioni basali di Hcy non è stata inclusa nei criteri di arruolamento), interpretazione scorretta di uno dei bracci di trattamento (la sola somministrazione di vitamina B6 costituisce un

**Tabella 2**  
Caratteristiche principali degli studi di intervento con trattamento dell'omocisteinemia attualmente conclusi

Studio <sup>a</sup>	Disegno <sup>b</sup>	Popolazione	No. pazienti/ "follow-up" (anni)	Somministrazioni (mg/giorno)			Controllo (mg/giorno)	"End point" primari	Associazione (IC 95%)
				Folato	Vitamina B12	Vitamina B6			
HOST	Prevenzione primaria	Insufficienza renale cronica	2056/3,2	40	2	100	Placebo	Mortalità per ogni causa	HR 1,04 (0,91-1,18)
NORVIT	Prevenzione secondaria (PS)	CHD	3749/3,3	0,8	0,4	40	Placebo	Composito: IMA, "stroke", morte improvvisa per CHD	RR 1,22 (1,00-1,50) RR 1,08 (0,93-1,25) RR 1,14 (0,98-1,32)
				0,8	0,4	-			
				-	-	40			
WENBIT	PS	CHD	3096/3,2	0,8	0,4	40	Placebo	Composito: mortalità per ogni causa, IMA, angina instabile, "stroke" tromboembolico	NC HR 1,09 (0,90-1,32) HR 0,90 (0,74-1,09)
VISP	PS	"Stroke"	3680/2,0	2,5	0,4	25	Folato 0,02 B12 0,06 B6 0,2	Infarto cerebrale recidivante	RR 1,0 (0,80-1,3)
HOPE 2	PS	CHD, diabete	5522/5,0	2,5	1	50	Placebo	Composito: mortalità per cause cardiovascolari. IMA, "stroke"	RR 0,95 (0,84-1,07) Rianalisi per stroke: HR 0,75 (0,59-0,97) "stroke" HR 0,72 (0,54-0,95) "stroke" non fatale OR 0,95 (0,57-1,56) deficit neurologici
WAFACS	PS	CHD	5442/7,3	2,5	1	50	Placebo	Composito: mortalità per cause cardiovascolari. IMA, "stroke"	RR 1,03 (0,90-1,19)
CHAOS 2	PS	CHD	1882/2,0	5,0	-	-	Placebo	IMA non fatale	RR 1,91 (0,96-3,82)
Goes	PS	CHD	593/2,0	0,5	-	-	"Standard care"	Composito: morte cardiovascolare, morte non cardiovascolare, IMA recidivante, procedure coronariche invasive, TIA, "stroke", chirurgia vascolare	RR 1,05 (0,63-1,75)
Goes (estensione del "follow-up" e rianalisi dei dati)	PS	CHD	593/3,5	0,5	-	-	"Standard care"	Composito: eventi vascolari, sindrome coronaria acuta definita in base ai valori di troponina cardiaca	RR 0,85 (0,56-1,31)
FOLARDA	PS	CHD	283/1,0	5,0	-	-	"Standard care"	Composito: morte cardiovascolare, morte non cardiovascolare, IMA e ischemia recidivanti, procedure di rivascularizzazione in urgenza	RR 0,88 (0,30-2,54) mortalità RR 3,06 (0,13-74,58) "stroke" RR 0,77 (0,27-2,15) angina instabile RR 0,82 (0,33-2,01) IMA

<sup>a</sup>Per il significato degli acronimi vedere testo.

<sup>b</sup>Tutti gli studi sono randomizzati.

IC, intervallo di confidenza; HR, "hazard ratio"; IMA, infarto acuto del miocardio; CHD, malattia coronarica ischemica; RR, rischio relativo; NC, non calcolato; OR, "odds ratio"; TIA, attacco ischemico transitorio.

braccio placebo e non un braccio trattamento, non essendo provato che tale monoterapia sia in grado di ridurre le concentrazioni di omocisteinemia) e, infine, impostazione dei confronti tra bracci (mancano i dati di confronto terapia vs. placebo). "Bias" di questa portata hanno prodotto un'apparente tendenza verso l'aumento del rischio di "end point" primari e la segnalazione di possibile effetto dannoso della supplementazione vitaminica. Il riesame dei dati secondo standard metodologici più corretti ha evidenziato una tendenza verso la riduzione del rischio in tutti i gruppi in terapia. Tuttavia lo studio NORVIT presenta, anche al riesame, dei dati di difficile interpretazione: ad esempio, i risultati delle concentrazioni sieriche di folati nel gruppo placebo, aumentati nel corso dello studio, che rendono di fatto, poco corretto interpretare il gruppo come placebo. Come ultima osservazione è da notare che gli Autori indicano come possibile effetto avverso della somministrazione vitaminica l'insorgenza di neoplasie. Tale dato ha avuto una grande risonanza nell'opinione pubblica; tuttavia, anche in questo caso, i dati sono estremamente deboli: gli Autori dello studio non fanno menzione di avere registrato gli eventi cancerosi, le loro complicazioni o progressioni, ed è da supporre che i fenomeni manifestati nel primo anno dopo l'inizio del "trial" siano dovuti a situazioni pregresse fino ad allora non evidenziabili.

Il "Western Norway B vitamin intervention trial" (WENBIT) è uno studio realizzato in Norvegia fra il 1999 e il 2006 (31). Sono stati randomizzati per ricevere il trattamento o placebo 3096 pazienti sottoposti ad angiografia per sospetta malattia coronarica e/o stenosi della valvola aortica. La riduzione media delle concentrazioni di omocisteinemia dopo 1 anno di trattamento è stata del 30%. Durante i 38 mesi di "follow-up" l'"end point" primario composito (mortalità, eventi cardiovascolari, "stroke") ha avuto un'incidenza complessiva del 13,7%: 14,2% nei pazienti che erano in trattamento con acido folico e vitamina B12 contro il 13,1% nei placebo e 13,0% nei pazienti riceventi vitamina B6 contro il 14,3% nei placebo. Sebbene non fosse dimostrabile una significativa differenza fra i gruppi, lo studio è stato terminato in anticipo a causa della preoccupazione suscitata dai risultati ottenuti con lo studio NORVIT. Le conclusioni a cui sono giunti gli Autori sono che "lo studio non ha evidenziato effetti sulla mortalità totale o sugli eventi cardiovascolari con il trattamento con acido folico e vitamine del gruppo B. I risultati non supportano l'uso di supplementazione vitaminica con vitamine del gruppo B come prevenzione secondaria in pazienti con malattia coronarica" (31).

"Vitamin intervention for stroke prevention" (VISP) è uno studio realizzato negli Stati Uniti, Canada e Scozia fra il settembre 1996 e il maggio 2003 (32). Sono stati randomizzati per il trattamento vitaminico a basso dosaggio e ad alto dosaggio 3680 pazienti con diagnosi di "stroke" ischemico non disabilitante e concentrazioni di omocisteinemia maggiori del 25° percentile relativo alla popolazione con "stroke" del Nord America. L'obiettivo dello studio è stato quello di determinare se la

supplementazione vitaminica ad alto dosaggio, riducendo le concentrazioni di omocisteinemia, riducesse anche il rischio di recidiva di "stroke" in un periodo di osservazione di 2 anni in confronto con la supplementazione a basso dosaggio. La riduzione media delle concentrazioni di omocisteinemia è stata di 2 µmol/L, ma non c'è stato nessun effetto del trattamento sull'"end point". Il RR, non aggiustato per "stroke", malattia coronarica o morte, è stato 1,0 con probabilità di eventi a 2 anni del 18,0% nel gruppo con somministrazione ad alta dose e del 18,6% nel gruppo a bassa dose. Il rischio di "stroke" ischemico a 2 anni è stato del 9,2% per il gruppo ad alta dose e del 8,8% per il gruppo a bassa dose (RR 1,0). I dati conclusivi indicano che "una riduzione moderata dell'omocisteinemia totale "post-stroke" non ha avuto effetto sull'"outcome" vascolare durante i due anni di "follow-up". Tuttavia, l'evidenza di una stretta associazione fra le concentrazioni di Hcy totale e rischio vascolare suggeriscono di condurre ulteriori studi, e che sono necessari studi più lunghi su differenti popolazioni con iperomocisteinemia" (32). Una informazione rilevante sullo studio è l'alto tasso di "compliance" alla terapia vitaminica dimostrato da dosaggi biochimici e dalla consistente riduzione dell'omocisteinemia proporzionale ai dosaggi nei bracci in terapia. I problemi metodologici dello studio vertono prima di tutto sul problema della fortificazione obbligatoria delle farine iniziata durante il "trial" a causa della quale le concentrazioni di Hcy basali potevano essere troppo basse per mostrare un effetto del trattamento, ma anche sulla durata del "follow-up" e sulla potenza statistica dello studio: dato il basso numero di eventi e presupponendo di voler evidenziare una riduzione del rischio di circa il 10%, lo studio avrebbe dovuto reclutare circa 20.000 partecipanti.

Gli Autori hanno poi condotto una rianalisi dei dati, esaminando il sottogruppo di soggetti con carenza di B12 (l'unica carenza che si può verificare spontaneamente nella popolazione fortificata e causare iperomocisteinemia), eliminando i soggetti con livelli di B12 estremi [molto alti (da supplementazione diversa da quella eventualmente fornita dal "trial") e molto bassi (per malassorbimento)] e confrontando l'"outcome" tra il gruppo ad alto livello di B12 e a basso livello di B12 (33). Da tale analisi emerge una riduzione del rischio ("end point" composito: morte, eventi coronarici e attacchi ischemici cardiaci) del 21%. Quindi la rianalisi del VISP ha prodotto dati favorevoli al trattamento, anche se è da notare che i successivi "trial" non hanno confermato questo dato.

"Heart outcomes prevention evaluation-2 study" (HOPE 2) è uno studio realizzato in Canada dal 2000 al 2005 (34). Sono stati sottoposti a trattamento o a placebo per 5 anni 5522 pazienti con diabete o malattia vascolare. La riduzione media della Hcy sierica è stata di 2,4 µmol/L nel gruppo trattato, mentre nel gruppo placebo si è avuto un aumento di 0,8 µmol/L. L'"outcome" primario, composito di morte per cause cardiovascolari, infarto del miocardio e "stroke", si è

**Tabella 3**

Caratteristiche principali dei studi in intervento con trattamento dell'omocisteina ancora in corso

Studio <sup>a</sup>	Disegno <sup>b</sup>	Popolazione	No. pazienti/ "follow-up" anni	Somministrazioni (mg/giorno)			Controllo	"End point" primari	"End point" secondari
				Folato	Vitamina B12	Vitamina B6			
FAVORIT	Prevenzione primaria	Insufficienza renale cronica in trapianto renale stabile	4110/9,0	5,0	1,0	50	Vitamine a basso dosaggio senza acido folico	CHD, incluso eventi cardiaci, cerebrali e periferici	Rigetto renale, mortalità per ogni causa, stima della funzione renale basata sulla creatininemia
VITATOPS	Prevenzione secondaria (PS)	"Stroke", TIA	8000/2,5	2,0	0,5	25	Placebo	"Stroke", IMA non fatale e morte per cause vascolari	TIA, procedure di rivascolarizzazione, demenza, depressione
SU.FOL.OM3	PS	IMA, angina instabile, "stroke"	2501/5,0	0,56 (5-MTHF)	0,02	3,0	Placebo	Combinazione di IMA, "stroke", morte cardiovascolare	Eventi composti presi separatamente, mortalità totale e altri eventi cardiovascolari
SEARCH	PS	IMA, CHD	12064/7,0	2,0	1,0	-	Placebo	Eventi vascolari maggiori	Eventi vascolari maggiori presi separatamente, eventi vascolari maggiori in presenza/assenza di simvastatina, eventi coronarici maggiori, "stroke"
NORVIT e WENBIT	Estensione studio prospettico di coorte	CHD	6839/16,0	0,8	0,4	40	Placebo	Neoplasia	Eventi cardiovascolari maggiori, mortalità per tutte le cause e per cause specifiche

<sup>a</sup>Per il significato degli acronimi vedere testo.<sup>b</sup>Tutti gli studi sono randomizzati.

CHD, malattia coronarica ischemica; TIA, attacco ischemico transitorio; IMA, infarto acuto del miocardio; 5-MTHF, 5-metilentetraidrofolato.

verificato nel 18,8% del gruppo in terapia e nel 19,8% nel gruppo placebo (RR 0,95, IC 95%: 0,84-1,07). Dato interessante, lo "stroke" sembra colpire meno i pazienti in trattamento (RR 0,75, IC 95%: 0,59-0,97), sebbene in questi pazienti si registrasse un maggior numero di ospedalizzazioni per angina instabile. Anche HOPE è stato sottoposto ad una ulteriore analisi per sottogruppi di pazienti, che ha evidenziato una significativa diminuzione dei nuovi casi di "stroke" e del rischio di "stroke" non fatale, sebbene non si sia realizzato un impatto sui deficit neurologici a 24 ore o sui deficit funzionali alla dimissione o dopo 7 giorni dall'evento (35). I benefici maggiori sono per i pazienti di età inferiore a 69 anni, provenienti da zone dove non sono in uso farine fortificate con acido folico, con concentrazioni basali elevate di colesterolo e omocisteina, che non ricevevano farmaci antiaggreganti piastrinici o ipocolesterolemizzanti al momento dell'arruolamento. I dati positivi relativi allo "stroke" avevano, al momento della diffusione dei risultati, rialzato le speranze sia della comunità scientifica che dei media su un possibile ruolo delle terapie con folati nell'ambito della prevenzione.

"Women's antioxidant and folic acid cardiovascular study" (WAFACS) è uno studio realizzato negli Stati Uniti dal maggio 1993 al febbraio 2005 (36). Sono stati trattati, randomizzati per ricevere il trattamento o placebo, 5442 pazienti ad alto rischio di eventi vascolari con storia di malattia cardiovascolare arteriosclerotica. A fronte di 7,3 anni di trattamento e "follow-up" e sebbene le concentrazioni di omocisteinemia siano diminuite del 18,5% nel gruppo attivo vs. placebo, nei due gruppi si è

avuto lo stesso rischio per "end point" primario composito, dato da infarto del miocardio, "stroke", rivascolarizzazione coronaria e mortalità cardiovascolare (RR 1,03, 95% IC: 0,90-1,19), così come per gli "outcome" secondari (infarto del miocardio RR 0,87, IC 95%: 0,63-1,22; "stroke" RR 1,14, IC 95%: 0,82-1,57; mortalità per cause cardiovascolari RR 1,01, IC 95%: 0,76-1,35).

Goes (dal nome di una delle città olandesi dove si è svolto lo studio) è uno studio realizzato fra novembre 1998 e gennaio 2002 (37). I pazienti (593) con storia precedente di malattia cardiovascolare sono stati randomizzati nei bracci acido folico e placebo. Al momento dell'arruolamento tutti i pazienti erano in terapia con statine, in media da 3,2 anni. Il "follow-up" mediano è stato di 24 mesi. I risultati mostrano nei pazienti del braccio trattato una diminuzione del 18% delle concentrazioni sieriche di Hcy; tuttavia, mortalità ed eventi cardiovascolari non differiscono nei due bracci: il RR è infatti pari a 1,05 (IC 95%: 0,63-1,75). La estensione del "follow-up" dello studio a 42 mesi e la ridefinizione dell'infarto cardiaco in base ai valori di troponina plasmatica non hanno modificato i risultati precedentemente ottenuti (38). Gli Autori, pertanto, concludono che tale trattamento deve essere somministrato con cautela fino a che saranno disponibili altri più definitivi risultati.

FOLARDA è uno studio realizzato in Olanda (39). I pazienti (283), con storia precedente di malattia cardiovascolare, sono stati randomizzati per ricevere acido folico o placebo. Tutti i pazienti erano in



trattamento anche con statine. La durata del trattamento è stata di 1 anno. I risultati mostrano che la terapia con acido folico non riduce il rischio di morte cardiovascolare o morbilità nei pazienti con storia di malattia cardiovascolare e ipercolesterolemia in trattamento con statine. Anche in questo caso gli Autori dichiarano che sono necessari dati provenienti da studi più grandi per poter stilare definitive conclusioni sugli effetti dell'acido folico nella prevenzione secondaria.

CHAOS 2 è uno studio realizzato nel Regno Unito dal 1999 al 2002 (40). I pazienti (1882) con storia di malattia cardiovascolare sono stati randomizzati per ricevere acido folico o placebo. La durata del trattamento è stata di 2 anni. Sebbene i dati non siano mai stati pubblicati, gli Autori hanno commentato i dati nell'ambito di congressi scientifici (40). Anche questo studio non supporta la somministrazione di acido folico nei pazienti con malattia cardiovascolare e moderata iperomocisteinemia sierica.

#### *Gli studi in corso*

Attualmente sono ancora in corso 4 studi di intervento e un "follow-up" a lungo termine sulla popolazione sottoposta a trattamento di due grandi "trials" conclusi (Tabella 3). Di seguito sono riportati i dati salienti di ognuno di essi.

"Folic acid for vascular outcome reduction in transplantation" (FAVORIT) è uno studio multicentrico di prevenzione primaria randomizzato in doppio cieco attualmente in corso negli Stati Uniti, iniziato nel maggio 2002 con termine previsto per la raccolta degli "outcome" primari nell'ottobre 2011 (41). Lo studio prevede il reclutamento di 4110 pazienti in insufficienza renale cronica sottoposti a trapianto renale e la randomizzazione in due bracci. I soggetti del braccio trattamento sono sottoposti a completa supplementazione vitaminica ad alto dosaggio, ulteriormente fortificata con acido folico, vitamina B6 e B12; nel braccio di controllo viene somministrato un regime vitaminico completo a basso dosaggio con esclusione dell'acido folico e con dosi giornaliere minime raccomandate di vitamina B6 e B12. Gli eventi vascolari fatali e non, inclusi gli eventi coronarici, cerebrali e periferici, costituiscono l'"outcome" primario composito. Il rigetto renale e la mortalità per qualunque causa sono considerati "outcome" secondari.

"Vitamins to prevent stroke" (VITATOPS) è uno studio randomizzato in doppio cieco multicentrico di prevenzione secondaria in corso in Australia (42). L'arruolamento è iniziato nel novembre del 1998 e si è concluso a fine dicembre 2005, ma è previsto che possa essere continuato, così come il "follow-up", se le analisi in itinere lo richiedessero. I pazienti (totale 8000) con storia di "stroke" o attacco ischemico transitorio (TIA) nei sette mesi precedenti l'arruolamento sono trattati giornalmente con 2 mg di acido folico, 25 mg di vitamina B6 e 500 µg di vitamina B12 o placebo. Il "follow-up" previsto è di 2,5 anni. La pubblicazione dei risultati è attesa a breve.

"Supplementation with folate, vitamin B6 and B12 and/or omega-3 fatty acid" (SU.FOL.OM3) è un "trial" randomizzato in doppio cieco, multicentrico, di prevenzione secondaria in corso in Francia, iniziato nel 2003 con termine previsto nel 2009 (43). I pazienti reclutati (totale 2501) hanno una storia nei dodici mesi precedenti l'arruolamento di infarto del miocardio, angina instabile o "stroke" e sono trattati giornalmente con 560 µg di 5 metilentetraidrofolato, 3 mg di vitamina B6 e 20 µg di vitamina B12 e/o omega-3 acidi grassi 600 mg o placebo. Il "follow-up" medio è di 5 anni. L'"outcome" primario è infarto del miocardio, "stroke" ischemico e morte cardiovascolare. Gli "outcome" secondari sono mortalità totale e altri eventi cardiovascolari. L'ipotesi dello studio è determinare se la supplementazione con una forma naturale di folato e/o acidi grassi omega-3 in una popolazione di soggetti con storia di eventi vascolari possa ridurre gli eventi vascolari fatali e non.

Lo "Study of the effectiveness of additional reductions in cholesterol and homocysteine" (SEARCH) è uno studio multicentrico randomizzato, in doppio cieco, di prevenzione secondaria in corso in Inghilterra, iniziato nel 1998 con conclusione del "follow-up" nel 2008 (44). Lo studio ha reclutato 12064 pazienti con pregresso infarto, randomizzati a ricevere terapia con statine ad alte dosi (80 mg) o basse dosi (20 mg) e supplementazione vitaminica con 2 mg acido folico, 1 mg vitamina B12 o placebo. Nel 2004 il comitato di controllo ha ricalcolato la potenza statistica dello studio, decidendo che il "trial" per rilevare una differenza di rischio tra i due bracci di circa il 10% richiedeva almeno 2800 eventi. Il "follow-up" sarà quindi portato a 7 anni. Un'ulteriore modifica al protocollo è stata introdotta quando la verifica in itinere dell'incidenza dei casi di eventi coronarici maggiori è risultata del 2,6%, invece che di circa il 4%, come indicato da "trials" condotti su popolazioni simili. In considerazione della bassa numerosità di eventi è stato ampliato l'"outcome" primario non più definito da "eventi coronarici maggiori", ma come "eventi vascolari maggiori" (includendo anche "stroke", rivascolarizzazioni non coronariche, amputazioni, oltre agli eventi coronarici maggiori). La pubblicazione dei dati è attesa a breve.

Relativamente a NORVIT e WENBIT, gli Autori dei due "trials" hanno programmato un periodo di "follow-up post-trial" a carico dei pazienti originariamente reclutati (45). L'obiettivo principale è quello di verificare i possibili effetti protettivi o promozionali del cancro su pazienti che hanno assunto per anni acido folico e vitamine del gruppo B. Tale osservazione risulta particolarmente interessante in quanto entrambi gli studi si sono svolti in paesi senza fortificazione delle farine alimentari e i dati non sono quindi influenzati da ciò. Gli Autori valuteranno il rischio di sviluppare una neoplasia sia retrospettivamente, durante il periodo degli studi (completati fra il 2004 e il 2005), sia in senso prospettico durante il "follow-up" post-trial" (1998-2014). Un ulteriore obiettivo è quello di valutare l'effetto della pregressa supplementazione vitaminica sugli "outcome"

cardiovascolari. Gli "outcome" secondari sono mortalità per ogni causa e morte per cause specifiche durante il "trial" e durante il "follow-up post-trial". Il rationale per tale studio aggiuntivo deriva da una serie di dati contraddittori pubblicati in anni recenti che suggeriscono che l'acido folico possa prevenire la trasformazione delle cellule normali in cancerose, ma anche che, al contrario, contribuisca alla crescita di una massa tumorale una volta che questa si è formata (46). La domanda sui possibili effetti avversi della supplementazione con acido folico è di fondamentale importanza anche per gli amministratori della salute pubblica che devono decidere se fortificare o meno gli alimenti. La speranza è che il "follow-up post-trial" di NORVIT e WENBIT possa fornire la risposta definitiva.

### Le metanalisi

L'importanza del quesito clinico e le informazioni contraddittorie o parziali emerse dai lavori citati hanno indotto la stesura di metanalisi, i cui dati di sintesi dovrebbero fornire le evidenze necessarie per supportare le scelte sanitarie.

Nel 2006 sono stati pubblicati due lavori: il primo di Bazzano et al. (47) relativo all'effetto della supplementazione con acido folico sul rischio cardiovascolare e cerebrovascolare ed il secondo di Wang et al. (48) inerente la supplementazione con acido folico e il rischio di "stroke".

Bazzano et al. esaminano i "trials" pubblicati dal 1996 fino al luglio 2006, selezionando gli studi controllati con un "follow-up" minimo di sei mesi, in cui esista un braccio sottoposto a terapia con acido folico ed un braccio con placebo o con terapia standard. La numerosità campionaria dei lavori inclusi è molto variabile: da un minimo di 81 a un massimo di 5522 soggetti. Gli Autori, includendo nella loro metanalisi studi condotti su pazienti con pregressa CHD, "stroke" o insufficienza renale, ottengono una popolazione di 16.958 soggetti e calcolano il RR di "outcome" per i pazienti trattati con acido folico rispetto ai controlli. La metanalisi indica un RR per patologia cardiovascolare di 0,95 (IC 95%: 0,88-1,03), per patologia coronarica un RR di 1,04 (IC 95%: 0,92-1,17), per "stroke" di 0,86 (IC 95% 0,71-1,04) e, infine, per mortalità da tutte le cause un RR di 0,96 (IC 95%: 0,88-1,04). Si tratta quindi di dati negativi o, per meglio dire, sulla base dei dati analizzati dalla metanalisi non esistono evidenze che indichino un effetto favorevole della terapia con acido folico nella prevenzione secondaria della patologia ischemica cardiovascolare, cerebrovascolare o della mortalità nelle popolazioni esaminate. Il risultato è deludente. La plausibilità biologica dell'"ipotesi omocisteina", tuttavia, fa sospettare che esistano possibili spiegazioni per la negatività dei dati di sintesi. Gli Autori, infatti, nella interessante discussione dei risultati, sottolineano un problema metodologico: la revisione ha un potere statistico del 84,2% per evidenziare una riduzione del 10% nel rischio di patologia cardiovascolare e del 64,1% per una riduzione del 10% nella mortalità. In altre parole,

la revisione non ha un pool di dati sufficientemente grande per evidenziare piccole differenze di "outcome". Il problema è superabile solo attingendo ai dati dei grandi "trials" ancora in corso alla data della pubblicazione della metanalisi.

Nel 2007 a breve distanza dal lavoro di Bazzano et al., viene pubblicata da Wang et al. una metanalisi relativa all'efficacia della terapia con acido folico nella prevenzione secondaria dello "stroke" (48). Gli Autori esaminano i "trials" pubblicati dal 1996 al luglio 2006 e selezionano 8 lavori (16.841 pazienti in totale) che riportano lo "stroke" fra gli "end point". I dati sono presentati stratificati per durata della terapia ( $\leq 36$  mesi o  $\geq 36$  mesi), percentuale di abbassamento della Hcy plasmatica secondariamente alla terapia ( $\geq 20\%$  o  $\leq 20\%$ ), presenza o assenza di fortificazione obbligatoria ed infine popolazione con o senza pregresso "stroke". I dati cumulativi appaiono di estremo interesse e indicano che la somministrazione di acido folico riduce il rischio di "stroke" (RR 0,82, IC 95%: 0,68-1,0), effetto che si fa più consistente in una serie di specifiche situazioni: se il "follow-up" è più lungo di 36 mesi (RR 0,71, IC 95%: 0,57-0,87), se l'abbassamento dell'omocisteinemia rispetto ai valori basali è superiore al 20% (RR 0,77, IC 95%: 0,63-0,94), se la popolazione non assume alimenti fortificati (RR 0,75, IC 95%: 0,62-0,90) e infine se i soggetti non hanno una storia clinica di pregresso ictus (RR 0,75, IC 95%: 0,62-0,90). Quest'ultimo sottogruppo configura una condizione di prevenzione primaria di grande rilevanza.

E' interessante notare che anche la revisione sistematica di Bazzano et al. forniva indicazioni a sostegno dell'utilità dell'acido folico nella prevenzione dello "stroke". Gli Autori, infatti, hanno condotto una operazione, denominata "analisi di sensibilità", che consiste nel verificare se la direzione dell'effetto cumulativo trovato varia escludendo progressivamente i singoli "trials". In altri termini, escludendo i dati di un singolo "trial" dal pool dei dati che entrano nella elaborazione statistica, il risultato della metanalisi dovrebbe essere sempre qualitativamente identico (ad esempio sempre "favorevole al trattamento" oppure sempre "nessuna differenza tra trattamento e placebo") e dovrebbe variare solo quantitativamente, mostrando variazione in quella che potremmo chiamare "intensità" dell'effetto. Questo tipo di operazione è un'ulteriore modalità di verifica di coerenza e solidità dai dati. L'analisi di sensibilità condotta nella revisione di Bazzano aveva messo in luce che l'esclusione dall'elaborazione statistica del "trial" VISP, condotto su soggetti con pregressa storia di ictus, portava ad un significativo effetto protettivo dell'acido folico nei confronti dello "stroke" espresso da un RR di 0,76 (IC 95%: 0,63-0,93).

I dati sembrano quindi suggerire che "end point" diversi possano rispondere in modo diverso alla supplementazione con acido folico. Tuttavia, ancora una volta, le speranze sembra vadano deluse: durante la preparazione della presente rassegna, è stata pubblicata una revisione sistematica di grande interesse (40). Tale

lavoro analizza 8 "homocystein-lowering intervention (HLI) trials" di prevenzione primaria o secondaria, per un totale di ben 24.210 partecipanti. Gli "outcome" studiati sono infarto miocardico, "stroke" e morte per qualsiasi causa. La maggior parte dei "trials" inclusi nello studio (CHAOS-2, FOLARDA, Goes, HOPE 2, NORVIT, VISP, WAFACS, WENBIT) presenta risultati negativi e non sorprende, quindi, che la misura di associazione ottenuta dalla metanalisi sia da interpretare come un dato non a favore del trattamento vitaminico per la diminuzione del rischio cardiovascolare. In particolare, gli Autori indicano per infarto un valore di RR pari a 1,03 (IC 95%: 0,94-1,13), per "stroke" un RR di 0,89 (IC 95%: 0,73-1,08) e per morte per ogni causa un RR di 1,00 (IC 95%: 0,92-1,09). Neppure l'incidenza di "stroke", quindi, sembra trarre beneficio dall'abbassamento delle concentrazioni di omocisteinemia, contrariamente a quanto indicato dai dati sopra riportati.

La lettura critica dei lavori condotta dagli Autori include una dettagliata analisi della qualità dei lavori primari e lo studio della loro eterogeneità, due elementi di novità rispetto alle precedenti metanalisi. La qualità degli studi, valutata in base a quattro elementi [cecità, randomizzazione, "allocation concealment" (occultamento della allocazione), registrazione delle perdite al "follow-up"] è giudicata accettabile; i calcoli statistici condotti per identificare la eterogeneità tra i lavori evidenziano, relativamente agli "outcome" maggiori (infarto miocardico e "stroke"), bassa eterogeneità. Tali osservazioni metodologiche supportano la robustezza delle evidenze.

Gli Autori suggeriscono che i dati derivanti dai "trials" ad alta numerosità ancora in corso (SEARCH, SU.FOL.OM3, VITATOPS), una volta elaborati insieme ai dati presentati, non saranno con molta probabilità in grado di modificare le evidenze, ma faranno sentire il proprio peso solo in termini di diminuzione dell'ampiezza dell'IC.

#### *Progetto per una metanalisi collaborativa*

Deve tuttavia essere ricordato che è ancora in corso una importante iniziativa, con lo scopo di chiarire, questa volta definitivamente, il quesito clinico. Il gruppo costituente la "B-vitamin treatment trialists' collaboration" ha proposto la realizzazione di una metanalisi cumulativa di tutti gli studi di intervento che valutano l'effetto della riduzione di omocisteinemia, secondariamente al trattamento con vitamine B sul rischio vascolare. Una metanalisi cumulativa consiste nell'aggiunta al calcolo statistico originario dei nuovi dati ogni volta che si renda disponibile un nuovo "trial" adatto all'inclusione (49).

Gli Autori si propongono di utilizzare i dati dei singoli pazienti e non i risultati globali degli studi, come di prassi. Questa impostazione metodologica, molto impegnativa, è resa possibile dalla volontà degli Autori dei "trials" e dei relativi finanziatori, di rendere disponibili i propri "database", nonché di impegnarsi a fornire eventuali informazioni aggiuntive per consentire le

analisi di sottogruppi. Il protocollo pubblicato dagli Autori prevede il pool dei dati di circa 52.000 partecipanti, di cui 32.000 costituiti da soggetti con dieta non fortificata e pregressa patologia cardiovascolare, 14.000 con dieta fortificata e pregressa patologia cardiovascolare e infine 6.000 con dieta fortificata e patologia renale (50). Saranno valutati serie di "end point" di interesse, quali eventi vascolari maggiori, "stroke", eventi coronarici maggiori, trombosi venosa, cancro e fratture. La metanalisi si propone anche di valutare gli "end point" in sottogruppi definiti in base al tipo di popolazione, fasce di età, sesso, patologie pregresse, bilancio vitaminico di base, durata del "follow-up". La pubblicazione del primo ciclo di analisi prevista per la fine del 2008 è stata spostata alla fine del 2009, mentre un'ulteriore analisi è prevista nel 2011, quando saranno disponibili i dati di tutti i lavori attualmente in corso.

#### **CONSIDERAZIONI FINALI**

Il peso delle patologie cardiovascolari e cerebrovascolari in termini di risorse umane ed economiche giustifica indubbiamente le energie che la ricerca scientifica impiega in questo campo. La individuazione di fattori di rischio controllabili rappresenta una sfida anche metodologica per la ricerca e la vicenda Hcy è, in questo senso, paradigmatica offrendo, come precedentemente accennato, spunti di riflessione.

Il problema del "bias" indotto dal modello di studio sulla forza dell'associazione è perfettamente esemplificato: l'aumento del rischio collegato ad alte concentrazioni di Hcy circolante è sceso da un iniziale 60% ad un 10%, quando i lavori sono stati attentamente valutati relativamente al disegno, all'andamento temporale (prospettico o retrospettivo), includendo aggiustamenti per i fattori di confondimento. Il riesame degli studi osservazionali, tuttavia, è stato condotto sulla spinta dei risultati inaspettatamente negativi dei primi "trials" HLI, i cui protocolli erano stati costruiti sulla base, si potrebbe dire sull'entusiasmo, delle prime stime di associazione e che, di conseguenza, mancavano della potenza statistica adeguata a fornire evidenze.

La precedente descrizione dei lavori conclusi e in corso illustra gli sforzi fatti nel tentativo di rispondere ad un quesito clinico oggettivamente interessante, ma anche di "grande richiamo". Gli studi progettati o riesaminati alla luce di dati epidemiologici più solidi hanno a loro volta fornito, inizialmente, dati contraddittori e si sono poi orientati verso dati negativi.

La concomitanza di evidenze contraddittorie e di quesiti clinici importanti, tuttavia, è il naturale campo di applicazione delle revisioni sistematiche, che, analizzando criticamente i lavori sperimentali e conducendo accurate analisi statistiche, possono dirimere problemi complessi. Non mancano esempi nella pratica clinica di trattamenti, oggi considerati "buona pratica", implementati anche con decenni di ritardo a causa di iniziali risultati contraddittori (24). La recente revisione di Marti-Carvajal et al. (40), tuttavia, lascia

pochi dubbi quando asserisce che “i risultati dei “trials” pubblicati indicano che non c’è evidenza a favore di terapie per la riduzione delle concentrazioni di omocisteinemia per la prevenzione delle patologie cardiovascolari”. In attesa della pubblicazione della metanalisi collaborativa del gruppo “B-vitamin treatment trialists’ collaboration”, che riunisce i maggiori esperti del settore, questa revisione è l’evidenza di maggiore forza a disposizione.

Sono possibili una serie di riflessioni relative alla relazione tra Hcy e patologia ischemica e trombotica, alcune delle quali suggerite da Loscalzo (51), che richiama l’attenzione sul fatto che l’“ipotesi omocisteina” possa essere una soluzione troppo semplice per un problema biochimico molto complesso. Infatti, anche se si avvalora l’ipotesi che Hcy sia un determinante aterogenico, per giustificare il debole successo della terapia con vitamine B e folati bisogna supporre che quest’ultima abbia degli effetti avversi che annullano il potenziale beneficio derivante dalla diminuzione della Hcy. Possono essere chiamati in causa tre diversi meccanismi. Il primo riguarda il ruolo svolto dall’acido folico nella sintesi della timidina e, attraverso di essa, nello stimolo alla proliferazione cellulare, che a livello di placca ateromatosa risulterebbe dannosa. Il secondo meccanismo coinvolge direttamente la Hcy; infatti, ad alte concentrazioni di Hcy si accompagna un basso potenziale di metilazione, ma la terapia con folati e vitamine B provoca un aumento delle possibilità di metilazione anche a carico di particolari regioni del DNA, un fenomeno che recentemente è stato implicato nel processo di formazione della placca (52). Infine, il terzo possibile meccanismo, sempre collegato con l’aumento della possibilità di metilazione, è dato dalla metilazione della L-arginina a dimetilarginina. Quest’ultima inibisce l’attività dell’ossido nitrico sintetasi, favorendo il danno dell’epitelio vascolare da radicali liberi.

Un ruolo importante nella ricerca sulla Hcy come fattore di rischio cardiovascolare è svolto dagli studi di genetica, che hanno evidenziato vari genotipi relativamente al gene che codifica MTHF reductasi, uno degli enzimi della via metabolica della Hcy. In particolare, la mutazione in posizione 677, che dà origine al genotipo C677T, prevede la sostituzione dell’amminoacido cisteina con timina, producendo le varianti, in omozigosi TT e in eterozigosi CT, che vanno ad affiancarsi al genotipo “wild type” CC. La mutazione, presente in circa il 10% della popolazione caucasica, implica alte concentrazioni di Hcy circolante. Studi di associazione tra la mutazione e il rischio cardiovascolare o di “stroke” hanno dimostrato che differenze di 3  $\mu\text{mol/L}$  nelle concentrazioni di Hcy fra i genotipi CC e TT sono associate approssimativamente al 10-15% di differenza di rischio di eventi cardiovascolari e al 20-25% del rischio di “stroke” (53).

Queste riflessioni, che ricordano la complessità dei meccanismi in gioco, attribuiscono ulteriore importanza alla necessità di investire ulteriori energie per indirizzare le successive ricerche.

In conclusione, alla luce dei dati sopra riportati si

comprende come la misura della Hcy come fattore di rischio cardiovascolare sia controversa e che le indicazioni fondamentali per la misura (a chi, quando e con quale scopo) siano ancora oggi dibattute. Può tuttavia essere utile distinguere due ambiti: ricerca clinica e prevenzione primaria e secondaria. Nell’ambito della ricerca, la misura della Hcy può essere eseguita per studi epidemiologici e per la valutazione di carenze vitaminiche e di malnutrizioni. Nell’ambito della prevenzione, la misura della Hcy per lo screening delle patologie cardiovascolari nella popolazione generale non è invece raccomandata. Più miratamente, nei soggetti con patologia cardiovascolare o in soggetti ad alto rischio di eventi cardiovascolari, la misura della Hcy può essere impiegata a fini prognostici. Qualora tali soggetti presentino valori di Hcy  $>15 \mu\text{mol/L}$ , essi devono essere considerati ad alto rischio e ricevere specifiche indicazioni per il controllo dei più tradizionali fattori di rischio cardiovascolare.

## BIBLIOGRAFIA

1. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. *J Biol Chem* 1986;261:1582-7.
2. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999;19:217-46.
3. Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, et al. Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1704-6.
4. Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE, et al. Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B6, B12 and folate. *Am J Epidemiol* 1996;143:845-59.
5. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 1998;44:1833-43.
6. Ubbink JB, Vermaak WJH, van der Merwe A, et al. Vitamin B-12, vitamin B-6, folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr* 1993;57:47-53.
7. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, et al. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability. *Clin Chem* 1993;39:263-71.
8. Ducros V, Demuth K, Sauvart MP, et al. Methods for homocysteine analysis and biological relevance of the results. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;781:207-26.
9. Hanson NQ, Eckfeldt JH, Schwichtenberg K, et al. Interlaboratory variation of plasma total homocysteine measurements: results of three successive homocysteine proficiency testing surveys. *Clin Chem* 2002;48:1539-45.
10. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004;50:3-32.
11. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, et al. DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic disease: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1392-403.
12. Møller J, Rasmussen K, Christensen L. External quality assessment of methylmalonic acid and total homocysteine. *Clin Chem* 1999;45:1536-42.
13. WHO (World Health Organisation). The word health



- report: reproducing risks, promoting healthy life. [http://www.who.int/whr/2002/en/whr02\\_en.pdf](http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_en.pdf).
14. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;53:111-28.
  15. McCully KS. Hyperhomocysteinemia and arteriosclerosis: historical perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:980-6.
  16. Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
  17. Squellerio I, Marenzi G, Veglia F, et al. Omocisteina, stress ossidativo e alterata sintesi di monossido d'azoto nelle patologie coronariche. *Biochim Clin* 2009;33:49-55.
  18. Weiss N. Mechanism of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Curr Drug Metab* 2005;6:27-36.
  19. Harker LA, Ross R, Slitcher SJ, et al. Homocysteine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; 58:731-41.
  20. Clarke R, Lewington S, Sherliker P, et al. Effects of B-vitamins on plasma homocysteine concentrations and on risk of cardiovascular disease and dementia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:32-9.
  21. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine; a meta-analysis of the randomized trials. *Am J Clin Nutr* 2005;82:806-12.
  22. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995;274:1049-57.
  23. The Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke. *JAMA* 2002;288:2015-23.
  24. Egger M, Smith GD, Altman DG. Systematic reviews in health care-meta-analysis in context. 2<sup>nd</sup> ed. London: BMJ Books, 2001.
  25. Clarke R, Shipley M, Lewington S, et al. Underestimation of risk association due to regression dilution in long-term follow-up of prospective studies. *Am J Epidemiol* 1999;150:341-53.
  26. Danesh J, Lewington S. Plasma homocysteine and coronary heart disease: systematic review of published epidemiological studies. *J Cardiovasc Risk* 1998;5:229-32.
  27. Ford ES, Smith SJ, Stroup DF, et al. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a systematic review of the evidence with special emphasis on case-control studies and nested case-control cases. *Int J Epidemiol* 2002;31:59-70.
  28. B-Vitamin Treatment Trialists' Collaboration. Homocysteine-lowering trials for prevention of cardiovascular events: a review of the design and power of the large randomized trials. *Am Heart J* 2006;151:282-7.
  29. Jamison RL, Hartigan P, Kaufman JS, et al. Effect of homocysteine lowering on mortality and vascular disease in advanced chronic kidney disease and end-stage renal disease. *JAMA* 2007;298:1163-70.
  30. Bønaa KH, Njølstad I, Ueland PM, et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;354:1578-88.
  31. Ebbing M, Bleie Ø, Ueland PM. Mortality and cardiovascular events in patients treated with homocysteine-lowering B vitamins after coronary angiography. *JAMA* 2008;300:795-804.
  32. 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.
  33. Spence JD, Bang H, Chambless LE, et al. Vitamin intervention for stroke prevention trial. An efficacy analysis. *Stroke* 2005;36:2404-9.
  34. The heart outcomes prevention evaluation (HOPE) 2 investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular diseases. *N Engl J Med* 2006;354:1567-77.
  35. Saposnik G, Ray JG, Sheridan P, et al. Homocysteine lowering therapy and stroke risk, severity and disability: additional findings from HOPE 2 trial. *Stroke* 2009; 40:1365-72.
  36. Albert C.M, Cook NR, Gaziano JM, et al. Effects of folic acid and B vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among woman at high risk for cardiovascular disease-A randomized trial. *JAMA* 2008; 299:2027-36.
  37. Liem A, Reynerse-Buitnwerf GH, Zwindermann AH, et al. Secondary prevention with folic acid: effects on clinical outcomes. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2105-13.
  38. Liem A, Reynerse-Buitnwerf GH, Zwindermann AH, et al. Secondary prevention with folic acid: results of the Goes extension study. *Heart* 2005;91:1213-4.
  39. Liem AH, van Boven AJ, Veeger NJGM, et al. Efficacy of folic acid when added to statin therapy in patients with hypercholesterolemia following acute myocardial infarction: a randomized pilot trial. *Intern J Cardiol* 2004;93:175-9.
  40. Marti-Carvajal AJ, Solà I, Lathyris D, et al. Homocysteine lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;7:CD006612.
  41. Bostom A Folic acid for vascular outcome reduction in transplantation (FAVORIT). *ClinicalTrials.gov* identifier: NCT00064753.
  42. Baker R VITATOPS: a study of vitamins to prevent stroke. *ClinicalTrials.gov* identifier: NCT00097669.
  43. Galan P, Briancon S, Blacher J, et al. The SU.FOL.OM3 study: a secondary prevention trial testing the impact of supplementation with folate and B-vitamins and/or omega3 PUFA on fatal and non fatal cardiovascular events: design, methods and participants characteristics. *Trials* 2008;9:35.
  44. SEARCH study collaborative group. Study of the effectiveness of additional reduction in cholesterol and homocysteine (SEARCH): characteristics of a randomized trial among 12064 myocardial infarction survivors. *Am Heart J* 2007;154:815-23.
  45. Ebbing M. NORVIT and WENBIT - long term follow-up (NORVIT-WENBIT). *ClinicalTrials.gov* identifier: NCT00671346.
  46. Kim YI. Folic acid fortification and supplementation - Good for some but not so good for others. *Nutrition Reviews* 2007;65:504-11.
  47. Bazzano LA, Reynolds K, Holder KN, et al. Effects of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2006;296:2720-6.
  48. Wang X, Qin X, Dermitas H, et al. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *Lancet* 2007;369:1876-82.
  49. Lau J, Schmid CH, Chalmers TC. Cumulative meta-analysis of clinical trials builds evidence for exemplary medical care. *J Epidemiol* 1995;48:45-57.
  50. B-Vitamin treatment trialists' collaboration. Homocysteine-lowering trials for prevention of vascular disease: protocol for a collaborative meta-analysis. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1575-81.
  51. Loscalzo J. Homocysteine trials-clear outcomes for



- complex reasons. *N Engl J Med* 2006;354:1629-32.
52. Loscalzo J. Adverse effects of supplemental L-arginine in atherosclerosis: consequences of methylation stress in a complex catabolism? *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:3-5.
  53. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, et al. MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2023-31.