

La predisposizione familiare alla cardiopatia ischemica: ruolo dell'omocisteina e del polimorfismo genetico della metilendetraidrofolato reduttasi

Luciano Potena, Francesco Grigioni, Vilma Mantovani*, Gaia Magnani, Carlo Magelli, Angelo Branzi

Istituto di Malattie dell'Apparato Cardiovascolare, *Laboratorio di Biologia Genetica, Università degli Studi, Bologna

Key words:
Atherosclerosis;
Genetics; Homocysteine;
Risk factors.

Homocysteine represents a risk factor for coronary artery disease determined not only by nutritional habits, but also by the genetic polymorphism of the enzymes involved in its metabolism (i.e. methylenetetrahydrofolate reductase - MTHFR). However, recent prospective studies questioned the initial evidence of a clear epidemiological and pathogenetic link between homocysteine levels and coronary artery disease. Moreover, the relationships between MTHFR polymorphism and coronary artery disease remain unclear.

In this paper, the recent literature analyzing the role of homocysteine and MTHFR polymorphism as a risk factor for coronary artery disease has been reviewed.

(Ital Heart J Suppl 2001; 2 (7): 748-753)

© 2001 CEPI Srl

Premio Giovani
Ricercatori, SIC 2000.

Ricevuto il 10 gennaio
2001; accettato il 6
marzo 2001.

Per la corrispondenza:

Dr. Carlo Magelli

Istituto di Malattie
dell'Apparato
Cardiovascolare
Università degli Studi
Policlinico S. Orsola-
Malpighi
Via Massarenti, 9
40138 Bologna
E-mail: potenamed@
hotmail.com

Introduzione

Quanto pesa in patologia cardiovascolare la familiarità, o meglio, la predisposizione genetica nel determinare il rischio di eventi cardiovascolari?

La familiarità è il fattore di rischio cardiovascolare più sfuggente nella pratica clinica quotidiana, sia per la non facile definizione e presunta ineluttabilità, sia perché in fondo, le malattie cardiovascolari sono il risultato di una complessa interazione tra predisposizione genetica ed influenza ambientale. La sfida della ricerca moderna è orientata verso il chiarimento di quest'interazione che, oltre a fattori strettamente ereditari, comprende abitudini e comportamenti tipicamente "familiari", come l'alimentazione, che possono di per sé rappresentare un fattore di rischio. Lo studio integrato di questi elementi mira quindi a trasformare l'"ineluttabile" in prevedibile e curabile¹.

L'elevata incidenza di morti cardiache in pazienti affetti da omocistinuria (una rara patologia geneticamente determinata e caratterizzata da valori plasmatici di omocisteina significativamente elevati) ha consentito di includere anche l'omocisteina tra i fattori di rischio cardiovascolare ereditabili². Successivamente, numerosi studi han-

no mostrato come in realtà anche un moderato aumento delle concentrazioni plasmatiche di omocisteina sia associato ad un'elevata prevalenza di eventi cardiovascolari³⁻⁵. Recenti acquisizioni hanno documentato inoltre che tali moderati aumenti possono essere in molti casi determinati da mutazioni genetiche ad elevata prevalenza nella popolazione generale⁶⁻⁸. Il significato di queste mutazioni genetiche sull'incidenza di eventi cardiovascolari è stato oggetto negli ultimi anni di numerosi studi^{6,9-13} che hanno, tuttavia, portato a risultati contrastanti.

I valori plasmatici di omocisteina, inoltre, sono sensibilmente influenzati non solo da fattori genetici, ma anche dietetici, questi ultimi peraltro facilmente modificabili¹⁴.

Scopo di questa rassegna è quello di puntualizzare il ruolo dell'omocisteina e l'influenza della familiarità per iperomocisteinemia nella determinazione del rischio cardiovascolare.

Metabolismo dell'omocisteina

L'omocisteina è un intermedio metabolico della metionina, un aminoacido essenziale solforato. Essa è necessaria per il me-

tabolismo dell'acido folico, coenzima fondamentale per la sintesi degli acidi nucleici, e della colina¹⁵.

Il catabolismo dell'omocisteina, che si svolge in gran parte nel rene, segue due vie principali: la remetilazione (attraverso la via della metionina-sintasi, metilene-tetraidrofolato reduttasi-MTHFR e betaina-sintasi), e la transulfurazione (attraverso la cistationina- β -sintasi) (Fig. 1).

Nella via della remetilazione, l'omocisteina viene re-metilata a metionina. L'MTHFR riduce il metilene-tetraidrofolato a metiltetraidrofolato, il quale, a sua volta, fornisce il gruppo metilico necessario per la trasformazione dell'omocisteina in metionina. Per tale reazione è necessaria inoltre come coenzima la transcobalamina (vitamina B12).

La betaina-sintasi partecipa anch'essa alla remetilazione (anche se in modo secondario), trasferendo un gruppo metilico dalla betaina all'omocisteina.

Nella transulfurazione invece, la cistationina- β -sintasi catalizza la reazione di condensazione dell'omocisteina con la serina, formando cistationina, attraverso l'azione del piridossalfosfato (vitamina B6) che funge da coenzima^{15,16}. La cistationina viene successivamente degradata a cisteina.

Mentre la remetilazione agisce a basse concentrazioni di omocisteina e di metionina, la transulfurazione entra in gioco per concentrazioni più elevate di omocisteina¹⁷.

La quota di omocisteina infine che non viene catabolizzata attraverso la transulfurazione o la remetilazione, viene esportata dalla cellula nel sistema circolatorio, dove per il 70-90% è legata a proteine plasmatiche e per il 10-30% forma dei complessi omocisteina-cistina oppure omocisteina-omocisteina. Solo una minima parte è presente come omocisteina libera.

I sistemi di dosaggio plasmatico dell'omocisteina misurano la concentrazione di omocisteina totale, intesa come la somma di tutte le forme circolanti¹⁸.

Iperomocisteinemia: dieta e genetica

Studi recenti hanno dimostrato come l'assunzione di supplementi di acido folico (da 0.5 a 5.7 mg/die) sia in grado di ridurre del 25% i valori di omocisteinemia. Un'ulteriore riduzione del 7% si è osservata inoltre dopo l'aggiunta di vitamina B12¹⁴. I supplementi di vitamina B6, invece, sono in grado di influenzare solo di poco i valori di omocisteinemia a digiuno, mentre appaiono efficaci dopo carico di metionina¹⁴.

Appare dunque chiaro che tra i tre cofattori vitaminici implicati nel metabolismo dell'omocisteina, la parte principale è giocata dall'acido folico. Esiste, infatti, una correlazione inversa tra valori plasmatici di acido folico ed omocisteinemia^{14,19}. Tale correlazione è però lineare solo fino a circa 6 ng/ml di folato sierico; oltre questo valore (che identifica un adeguato apporto vitaminico), la concentrazione di omocisteina cala di poco con l'aumentare della concentrazione di acido folico¹⁹. Lo stesso tipo di correlazione tra omocisteinemia e concentrazione vitaminica, pur se più debole, è presente anche per quanto riguarda le concentrazioni di vitamina B12 e vitamina B6. Per tale motivo, la definizione di valori normali di omocisteinemia si basa sulla concomitante presenza di un adeguato apporto vitaminico¹⁹. I valori di normalità proposti sulla base di una valutazione di oltre 4500 soggetti sono: 11.4 $\mu\text{mol/l}$ per i maschi e 10.4 $\mu\text{mol/l}$ per le femmine¹⁹.

Negli ultimi anni si è evidenziato come oltre all'apporto vitaminico anche varie mutazioni genetiche siano in grado di influenzare in maniera significativa l'omocisteinemia^{6,7,20-22}.

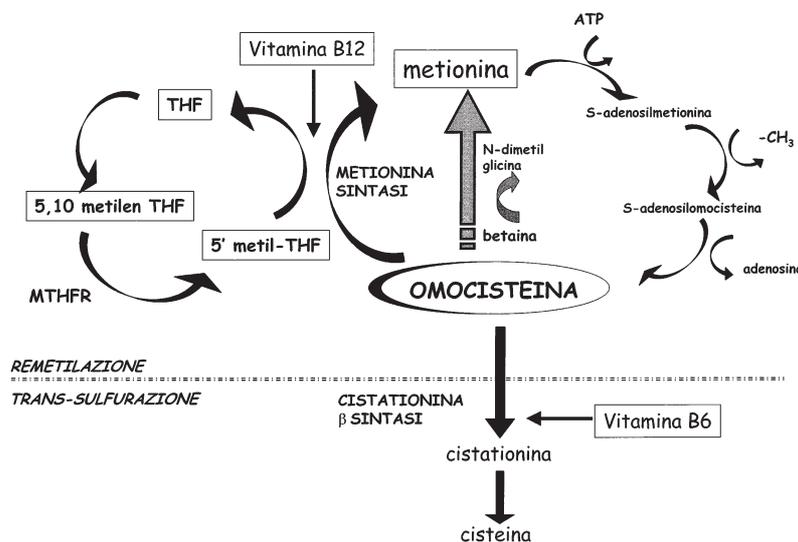


Figura 1. Nei riquadri sono indicati gli elementi assunti con la dieta. In maiuscolo sono indicati gli enzimi di cui sono state descritte mutazioni che rallentano il metabolismo dell'omocisteina. ATP = adenosina trifosfato; MTHFR = metilene-tetraidrofolato reduttasi; THF = acido tetraidrofolico.

Tra queste, la sostituzione C677→T nel gene dell'MTHFR (che porta alla sintesi di una forma termolabile dell'enzima con una ridotta attività catalitica) è tra quelle maggiormente investigate^{6,7,9,22}. Nell'ambito di tale mutazione è noto come il genotipo TT (omozigosi per la forma termolabile) predisponga a valori di omocisteina plasmatica più elevati rispetto al genotipo CT (eterozigosi per la forma termolabile), che a sua volta condiziona valori di omocisteinemia più elevati rispetto al genotipo CC (variante non mutata o "wild type")⁹. La capacità catalitica dell'enzima mutato, tuttavia, può essere ripristinata dalla presenza di adeguate concentrazioni plasmatiche di acido folico²³. È questo un chiaro esempio di interazione genético-ambientale nel determinare la predisposizione ad un fattore di rischio cardiovascolare: solo i soggetti portatori della forma termolabile dell'MTHFR ed allo stesso tempo con concentrazione plasmatica di acido folico tendenzialmente bassa (< 6 ng/ml)²³ tendono a sviluppare marcati gradi di iperomocisteinemia.

Meccanismi d'azione dell'omocisteina

I possibili meccanismi biologici dell'omocisteina in grado di favorire eventi aterotrombotici sono molteplici²⁴. In particolare, è stata indagata l'interazione tra omocisteina e fattori della coagulazione da una parte e tra omocisteina e componenti della parete vasale dall'altra.

Per quanto riguarda l'interazione con i fattori della coagulazione, numerose evidenze sperimentali mostrano come aumentate concentrazioni di omocisteina ostacolano i sistemi anticoagulanti naturali (proteina C attivata e trombomodulina)²⁵⁻²⁷. Negli individui affetti da omocistinuria, per esempio, è stata osservata una diminuita attività del fattore VII e dell'antitrombina III ed un'aumentata attività del fattore V^{28,29}.

Per quanto concerne invece l'interazione omocisteina-componenti della parete vasale, è noto come l'endotelio abbia un'importante funzione omeostatica sulla reattività e sulla fisiologia vasale stessa, rappresentando il primo bersaglio dei fattori aterogenetici. Tali fattori, agendo sulla funzione endoteliale attraverso un processo ossidativo-infiammatorio, stimolano l'infiammazione e la replicazione muscolare liscia e sono in grado di alterare in maniera patologica la reattività vascolare³⁰. Recenti studi suggeriscono come anche l'omocisteina sembri agire negativamente sull'omeostasi endoteliale, favorendo i processi ossidativi. *In vitro*, tale azione sembrerebbe esplicarsi attraverso un meccanismo diretto (secondario all'aumento del perossido di idrogeno per l'ossidazione del gruppo tiolico dell'omocisteina³¹⁻³³) e tramite un meccanismo indiretto (mediato dall'inibizione dell'attività dei sistemi antiossidanti cellulari, come la glutatione perossidasi³⁴).

A questo proposito è utile ricordare come l'influenza sull'attività proliferativa dell'endotelio e delle cellule muscolari lisce sia stata evidenziata anche *in vivo*, in animali nutriti con dieta ad alto contenuto di metionina, in modo da stimolare un'elevata produzione di omocisteina. Questi animali hanno sviluppato lesioni vascolari del tutto simili all'iperplasia fibro-intimale osservata, ad esempio, nella vasculopatia del graft nei pazienti con trapianto di cuore^{35,36}.

Tra le osservazioni sperimentali sull'uomo, è di notevole interesse il riscontro che incrementi fisiologici della concentrazione plasmatica di omocisteina, come accade dopo un carico alimentare di metionina, sono in grado di alterare la vasodilatazione endotelio-dipendente. La reversibilità di questo effetto secondaria alla somministrazione di antiossidante (vitamina C) sembra confermare le ipotesi di azione pro-ossidante dell'omocisteina³⁷.

Omocisteina, polimorfismo genetico e rischio cardiovascolare: evidenze epidemiologiche

Dopo le prime osservazioni in soggetti omocistinurici², numerosi studi trasversali e prospettici hanno mostrato come anche un moderato aumento dei valori di omocisteinemia sia un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di eventi cardiovascolari^{3-6,38}. Una meta-analisi di 27 studi sull'associazione tra omocisteinemia e cardiopatia ischemica, suggerisce che un aumento di 5 $\mu\text{mol/l}$ delle concentrazioni di omocisteina corrisponde ad un aumento di rischio cardiovascolare pari a quello secondario ad un aumento di 20 mg/dl di colesterolemia totale. Inoltre, da questi dati si deduce che il 10% del rischio cardiovascolare globale nella popolazione generale è legato alla presenza di iperomocisteinemia e che tale rischio aumenta gradualmente all'aumentare delle concentrazioni plasmatiche di omocisteina³⁸. Successivi studi prospettici hanno evidenziato un importante ruolo prognostico dei livelli di omocisteinemia nei pazienti affetti da coronaropatia angiograficamente significativa^{39,40}. In uno di questi³⁹, nei soggetti con omocisteinemia fino a 9 $\mu\text{mol/l}$ la mortalità a 4 anni era del 3.8%, mentre per quelli con omocisteinemia > 15 $\mu\text{mol/l}$ la mortalità raggiungeva il 24.7%.

Supplementi alimentari di acido folico sono in grado di ridurre l'omocisteinemia¹⁴, quindi potrebbero essere in grado di ridurre il rischio cardiovascolare, tanto che è stato calcolato che con l'aggiunta di acido folico ai derivati dei cereali, negli Stati Uniti, potrebbero essere evitate dalle 13 500 alle 50 000 morti l'anno per eventi cardiovascolari³⁸. Tale affermazione, tuttavia, necessita del sostegno di studi prospettici randomizzati, alcuni dei quali in corso, ed uno di recente pubblicazione⁴¹. In questo lavoro vengono randomizzati in doppio cieco 158 soggetti, senza evidenza clinica di cardiopatia ischemica, a ricevere 5 mg di acido folico e 250 mg di vitamina B6 vs placebo. La popolazione del-

lo studio era stata selezionata tra soggetti con valori patologici di omocisteinemia e con fratelli affetti da aterosclerosi precoce. I risultati mostrano una minore incidenza di positività per ischemia miocardica all'elettrocardiogramma da sforzo nei soggetti trattati per 3 anni con acido folico⁴¹.

Accanto all'aspetto dietetico, la ricerca clinica ha considerato anche l'aspetto genetico. La presenza della forma termolabile dell'MTHFR, che è associata ad iperomocisteinemia, pare essere più frequente negli individui affetti da cardiopatia ischemica^{6,7,42}. L'effetto negativo di questa alterazione genetica può, inoltre, essere abolito da un aumentato apporto alimentare di folati²³, configurando una familiarità di rischio (l'aspetto genetico), ampiamente modificabile dalle abitudini di vita (dieta ricca di folati).

Il quadro sin qui presentato apre uno scenario fin troppo ideale nella prevenzione della cardiopatia ischemica. L'omocisteina appare un nuovo fattore di rischio, facilmente correggibile, legato in parte ad una mutazione genetica relativamente frequente ed anch'essa ben identificabile e dall'effetto rimediabile. L'entusiasmo iniziale, tuttavia, è stato negli ultimi anni ridimensionato da ampi studi prospettici sia sull'effetto proaterogeno dell'omocisteina, sia sul ruolo del polimorfismo genetico^{9,11,43-45}.

Sebbene da una recente metanalisi di 33 studi coinvolgenti oltre 16 000 pazienti risulti che il rischio cardiovascolare legato all'omocisteina sia statisticamente significativo, gli stessi autori pongono dubbi sul reale significato biologico di tale osservazione statistica⁴³.

L'associazione tra omocisteina ed eventi cardiovascolari, infatti, appare molto forte soprattutto negli studi trasversali di tipo caso-controllo, mentre tende ad essere più debole quando viene valutata in studi prospettici⁴³ basati sulla popolazione generale⁴⁶. In uno di questi, l'omocisteinemia è risultata associata all'incidenza di cardiopatia ischemica ma, dopo aver considerato le concentrazioni plasmatiche di vitamine di gruppo B e la presenza di altri fattori di rischio, solo basse concentrazioni plasmatiche di vitamina B6 erano risultate associate in modo indipendente all'incidenza di cardiopatia ischemica⁴⁶. Inoltre, se l'iperomocisteinemia è un fattore di rischio per la cardiopatia ischemica, non è chiaro come il polimorfismo dell'MTHFR, importante determinante dei valori di omocisteinemia⁹, in studi recenti non appaia associato alla cardiopatia ischemica^{9,11,46}. Ancora, nella popolazione generale la mutazione responsabile della forma termolabile dell'enzima è relativamente frequente (8-18%)^{8,9} e quindi appare poco probabile che possa rappresentare un importante fattore di rischio indipendente per una malattia letale come la cardiopatia ischemica.

Alla luce di questi dati contrastanti possono essere formulate tre possibili ipotesi sul rapporto tra omocisteina e cardiopatia ischemica⁴⁴: 1) non esiste alcun rapporto causa-effetto tra l'omocisteina e l'incidenza di

cardiopatia ischemica. L'aumento dell'omocisteinemia rappresenterebbe un epifenomeno secondario allo stato infiammatorio cronico presente nell'aterosclerosi, così come la proteina C reattiva o la velocità di eritrosedimentazione⁴⁷; 2) la carenza di vitamine del gruppo B è in realtà la causa di incremento del rischio cardiovascolare: l'iperomocisteinemia sarebbe dunque solo un marker di carenza vitaminica^{46,48}; 3) l'iperomocisteinemia è direttamente legata allo sviluppo dell'aterosclerosi. I risultati contrastanti di alcuni studi prospettici possono essere spiegati con la non uniformità del campione studiato, il ridotto numero di soggetti, l'eterogeneità dei sistemi di dosaggio e gli errori di misura relativi al dosaggio.

Al momento attuale, ai dati evidenziati in passato sul ruolo proaterogeno dell'omocisteina e della sua regolazione genetica, si contrappongono oggi alcuni dubbi sulla reale importanza di questo "sospetto" fattore di rischio. Dubbi sostenuti anche dal fatto che quasi tutte le evidenze sperimentali sulla patogenesi dell'aterosclerosi secondaria ad iperomocisteinemia, sono state ottenute con concentrazioni di omocisteina molto maggiori di quelle osservate nell'uomo⁴⁴. Pertanto, nessuna delle tre ipotesi può essere confermata o smentita con certezza⁴⁴. Tuttavia, se da un lato non ci sono evidenze che lo studio dell'omocisteinemia abbia rilievo nella stratificazione del rischio cardiovascolare nella popolazione generale⁴⁴, dall'altro l'iperomocisteinemia e la predisposizione familiare legata al polimorfismo dell'MTHFR possono avere un ruolo in popolazioni con un elevato rischio di base di eventi cardiovascolari^{40,41,49}, ma anche in situazioni etniche ed ambientali selezionate^{50,51}.

Un esempio di popolazione ad elevato rischio cardiovascolare è rappresentato dai pazienti con trapianto di cuore. Gli eventi cardiovascolari si esprimono nella forma peculiare dell'aterosclerosi del graft, anche a solo 1 anno di distanza dal trapianto³⁶, e sono ancora una delle principali limitazioni alla sopravvivenza a lungo termine di questi pazienti⁵². Nei pazienti con trapianto di cuore l'omocisteinemia è maggiore che nella popolazione generale⁵³. Inoltre, dopo il trapianto, la concentrazione di omocisteina plasmatica tende ad aumentare⁵⁴, e continua a farlo nel tempo, e la terapia con supplementi di acido folico pare solo parzialmente efficace nel normalizzare il metabolismo omocisteinico⁵⁵. Mentre da più parti viene evidenziato che l'iperomocisteinemia sembra associata a vasculopatia del graft⁵⁶⁻⁵⁸, solo uno studio prende in considerazione il ruolo del polimorfismo dell'MTHFR in questi pazienti, concludendo che la mutazione C677→T non è associata a coronaropatia⁵⁸. Tuttavia questa conclusione è limitata dal fatto che gli autori non hanno tenuto conto della concentrazione serica di acido folico nei pazienti studiati. Il ruolo del polimorfismo genetico dell'MTHFR nei pazienti con trapianto di cuore rimane ancora poco indagato.

Conclusioni

La predisposizione familiare alla cardiopatia ischemica è rappresentata da un'interazione tra fattori genetici e condizioni ambientali, intese come abitudini di vita, spesso condizionate dal contesto familiare. Essa si esprime come la tendenza a presentare fattori di rischio cardiovascolari ereditabili, i quali possono avere un meccanismo patogenetico più o meno diretto sull'aterosclerosi e la cui espressione fenotipica risente dell'interazione ambientale e può, quindi, risentire di interventi terapeutici aggressivi mirati¹. Lo studio dell'associazione tra omocisteina e cardiopatia ischemica insegna in modo paradigmatico a tenere conto di queste interazioni: l'omocisteina è associata alla prevalenza di cardiopatia ischemica, è influenzata dalle abitudini dietetiche e dalla predisposizione genetica. L'adeguamento delle abitudini dietetiche (adeguato apporto vitaminico) è inoltre in grado di minimizzare le alterazioni del metabolismo su base genetica. Tuttavia, molti indizi ma poche prove di colpevolezza indicano oggi l'omocisteina ed i polimorfismi genetici del suo metabolismo associati all'incidenza di eventi cardiovascolari nella popolazione generale. La valutazione del metabolismo dell'omocisteina, comunque, potrebbe avere maggiore importanza in sottogruppi di pazienti a rischio aumentato di eventi cardiovascolari ed in popolazioni con aumentata tendenza familiare a sviluppare iperomocisteinemia.

Riassunto

L'omocisteina è un fattore di rischio cardiovascolare, la cui concentrazione plasmatica è il risultato di una stretta relazione tra abitudini dietetiche e fattori genetici predisponenti, come la presenza di isoforme a ridotto potere catalitico dell'enzima metilene-tetraidrofolato reductasi (MTHFR).

Tuttavia, se inizialmente sembrava chiaro un legame diretto sia epidemiologico che patogenetico tra iperomocisteinemia ed eventi vascolari, più recentemente alcuni studi prospettici hanno sollevato alcuni dubbi sul reale ruolo di questa alterazione metabolica sull'incidenza di eventi cardiovascolari nella popolazione generale.

In questo articolo viene rivisto il ruolo dell'omocisteina e del polimorfismo genetico dell'MTHFR quali fattori di rischio cardiovascolari, alla luce della letteratura più recente.

Parole chiave: Aterosclerosi; Fattori di rischio; Genetica; Omocisteina.

Bibliografia

1. Higgins M. Epidemiology and prevention of coronary heart disease in families. *Am J Med* 2000; 108: 387-95.

2. Mc Cully K. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-28.
3. Malinow M. Hyperhomocyst(e)inemia: a common and easily reversible risk factor for occlusive atherosclerosis. *Circulation* 1990; 81: 2004-6.
4. Mayer E, Jacobsen D, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 517-27.
5. 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.
6. Kang S, Passen E, Ruggie N, Wong P, Sora H. Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1993; 88: 1463-9.
7. Frosst P, Blom H, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-3.
8. Schneider J, Rees D, Liu Y, Clegg J. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1258-60.
9. Girelli D, Friso S, Trebbi E, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine and folate in subjects from northern Italy with and without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: evidence for an important genetic-environmental interaction. *Blood* 1998; 91: 4158-63.
10. Motti C, Gnasso A, Bernardini S, et al. Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine and other risk factors for vascular disease. *Atherosclerosis* 1998; 139: 377-83.
11. van Bockxmeer F, Mamotte C, Vasikaran S, Taylor R. Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. *Circulation* 1997; 95: 21-3.
12. Todesco L, Angst C, Litynski P, Loherer F, Fowler B, Haefeli W. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma homocysteine and age. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 1003-9.
13. Anderson J, King G, Thomson M, 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.
14. Malinow MR, Bostom AG, Kraus RM. Homocysteine, diet and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation* 1999; 99: 178-82.
15. Finkelstein JD, Martin J. Methionine metabolism in mammals: adaptation to methionine excess. *J Biol Chem* 1986; 261: 1582-7.
16. Ueland P. Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In: Francis RJ, ed. *Atherosclerotic cardiovascular disease: hemostasis and endothelial function*. New York, NY: Marcel Dekker, 1992: 183.
17. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals: adaptation to methionine excess. *J Biol Chem* 1986; 261: 1582-7.
18. Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987; 422: 43-52.
19. Selhub J, Jacques P, Rosenberg I, et al. Serum total homocysteine concentration in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. *Ann Intern Med* 1999; 131: 331-9.
20. Tsai M, Bignell M, Yang F, Welge B, Graham K, Hanson N. Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutation, the 844ins68 of cystathionine beta-synthase and A2756G of methionine synthase, with low-

- ered plasma homocysteine levels. *Atherosclerosis* 2000; 149: 131-7.
21. Weinsberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64: 169-72.
 22. Kang S, Zhou J, Wong P, Kowalysyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 414-21.
 23. Jacques P, Bostom A, Williams R, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93: 7-9.
 24. Thambyrajah J, Towned J. Homocysteine and atherothrombosis - mechanisms for injury. *Eur Heart J* 2000; 21: 967-74.
 25. Lentz S, Sadler J. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 1991; 88: 1906-14.
 26. Rodgers G, Conn M. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 895-901.
 27. Hayashi T, Honda G, Suzuki K. Homocysteine, an atherogenic stimulus, inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 1992; 79: 2930-6.
 28. Rodgers G, Kane W. Activation of endogenous factor V by a homocysteine induced vascular endothelial cell activation. *J Clin Invest* 1986; 77: 1909-16.
 29. Giannini MJ, Coleman M, Innerfield I. Antithrombin activity in homocystinuria. (letter) *Lancet* 1975; 1: 1094.
 30. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-9.
 31. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986; 77: 1370-6.
 32. Harker L, Slichter S, Scott C, Ross R. Homocysteinemia: vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med* 1974; 291: 537-45.
 33. Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocysteine induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res* 1980; 18: 113-21.
 34. Upchurch G, Welch G, Freedman J, Loscalzo J. Homocysteine attenuates endothelial glutathione peroxidase and thereby potentiates peroxide-mediated cell injury. (abstr) *Circulation* 1995; 92: 1086.
 35. Rolland PH, Friggi A, Barlatier A, et al. Hyperhomocysteinemia-induced vascular damage in the minipig. Captopril-hydrochlorothiazide combination prevents elastic alterations. *Circulation* 1995; 91: 1161-74.
 36. Johnson D, Gao SZ, Schroeder JS, DeCampli WR, Billingham ME. The spectrum of coronary artery pathologic findings in human cardiac allografts. *J Heart Transplant* 1989; 8: 349-59.
 37. Chambers J, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid O, Koener J. Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia - an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation* 1999; 99: 1156-60.
 38. Boushey C, Beresford S, Omenn G, Motulsky A. 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.
 39. Nygaard O, Nordehaug J, Refsum H, Ueland P, Farstad M, Vollset S. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 230-6.
 40. Anderson J, Muhlestein J, Horne B, et al. Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102: 1227-32.
 41. Vermeulen E, Stehouwer C, Twisk J, et al. Effect of homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B6 on progression of subclinical atherosclerosis: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 355: 517-22.
 42. Kluijtmans L, Kastelein J, Lindemans J, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1997; 96: 2573-7.
 43. Cleophas T, Hornastra N, van Hoogstraten B, van der Meulen J. Homocysteine, a risk factor for coronary artery disease or not? A meta-analysis. *Am J Cardiol* 2000; 86: 1005-9.
 44. Kuller L, Evans R. Homocysteine, vitamins, and cardiovascular disease. *Circulation* 1998; 98: 196-9.
 45. Ma J, Stampfer M, Hennekens C, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996; 94: 2410-6.
 46. Folsom A, Nieto F, McGovern P, et al. Prospective study of coronary artery disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins. *Circulation* 1998; 98: 204-10.
 47. Gillum R, Mussolino M, Makuc D. Erythrocyte sedimentation rate and coronary artery disease: the NHANES I epidemiologic follow-up study. *J Clin Epidemiol* 1995; 48: 353-61.
 48. Peterson JC, Spence JD. Vitamins and progression of atherosclerosis in hyper-homocyst(e)inaemia. (letter) *Lancet* 1998; 351: 263.
 49. Nowak-Gottl U, Strater R, Heinecke A, et al. Lipoprotein (a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin, and methylenetetrahydrofolate reductase are risk factors of spontaneous ischemic stroke in childhood. *Blood* 1999; 94: 3678-82.
 50. Jee S, Beaty T, Suh I, Yoon Y, Appel L. The methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with increased cardiovascular risk in Japan, but not in other populations. *Atherosclerosis* 2000; 153: 161-8.
 51. Zheng YZ, Tong J, Do XP, Pu XO, Zhou BT. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and its association with arterial and venous thrombosis in the Chinese population. *Br J Haematol* 2000; 109: 870-4.
 52. Hosenpud J, Bennet L, Keck B, Fiore B, Novick R. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: fourteenth official report. *J Heart Transplant* 1997; 16: 691-712.
 53. Ambrosi P, Barlatier A, Habib G, Garçon D. Hyperhomocysteinemia in heart transplanted recipients. *Eur Heart J* 1994; 15: 1191-6.
 54. Berger P, Jones J, Olson L, et al. Increase in total plasma homocysteine concentration after cardiac transplantation. *Mayo Clin Proc* 1995; 70: 125-30.
 55. Potena L, Grigioni F, Magnani G, et al. Increasing plasma homocysteine during follow-up in heart transplant recipients: effect of folate and renal function. *Ital Heart J* 2000; 1: 344-8.
 56. Ambrosi P, Garçon D, Riberi A, Habib G. Association of mild hyperhomocysteinemia with cardiac graft vascular disease. *Atherosclerosis* 1998; 138: 347-50.
 57. Gupta A, Moustapha A, Jacobsen D, Goosemastic M. High homocysteinemia, low folate and low vitamin B6 concentration: prevalent risk factors for vascular disease in heart transplant recipients. *Transplant* 1998; 65: 544-50.
 58. Pethig K, Hoffmann A, Heublein B, Timke A, Gross G, Haverich A. Cardiac allograft vascular disease after orthotopic heart transplantation: methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism C677T does not account for rapidly progressive forms. *Transplantation* 2000; 69: 442-5.