



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EFEECTO DE DEFICIENCIA DE ACIDO FOLICO,  
VITAMINA B12 O AMBAS EN LA REACTIVIDAD  
VASCULAR ENDOTELIO DEPENDIENTE EN UN  
MODELO ANIMAL

**MARÍA JOSÉ MONTEQUIN GONZÁLEZ**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal

**PROFESOR GUÍA: SANDRA HIRSCH BIRN**

SANTIAGO, CHILE  
2006



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EFFECTO DE DEFICIENCIA DE ACIDO FOLICO,  
VITAMINA B12 O AMBAS EN LA REACTIVIDAD  
VASCULAR ENDOTELIO DEPENDIENTE EN UN  
MODELO ANIMAL

**MARÍA JOSÉ MONTEQUIN GONZÁLEZ**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal

NOTA FINAL: .....

NOTA

FIRMA

PROFESOR GUÍA	: SANDRA HIRSCH B.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO:	MARÍA SOL MORALES S.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO:	RAMÓN MARTINEZ P.	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
2006

## INDICE

- Resumen.....	1
- Summary.....	3
- Introducción.....	5
- Revisión Bibliográfica.....	7
- Hipótesis.....	16
- Objetivo General.....	16
- Objetivos Específicos.....	16
- Material y Métodos.....	17
- Análisis Estadístico.....	20
- Resultados.....	21
- Discusión.....	24
- Conclusión.....	27
Bibliografía.....	28

## RESUMEN

En los últimos años se han identificado y estudiado funciones del ácido fólico relacionadas con la salud cardiovascular y el desarrollo de enfermedades tumorales en los individuos. El consumo de esta vitamina produce una reducción de los niveles sanguíneos de homocisteína, amino ácido asociado como factor de riesgo de enfermedad cardiovascular. Sin embargo, las últimas investigaciones plantearon la hipótesis que la hiperhomocisteinemia es solo un marcador de deficiencia de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>. En consecuencia, se ha planteado que la deficiencia de estas vitaminas podría tener un efecto causal en el desarrollo de enfermedad cardiovascular. El principal candidato podría ser el ácido fólico, debido a sus propiedades antioxidantes y por su participación directa en los procesos de metilación.

El objetivo de este estudio fue demostrar en un modelo animal que la deficiencia de ácido fólico, independiente de los niveles de homocisteína, altera la reactividad vascular endotelio dependiente.

**Metodología:** El estudio se realizó con 48 ratas Wistar macho, las cuales se dividieron en 4 grupos de acuerdo a su alimentación durante 8 semanas: A: deficiente en ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>, B: deficiente en ácido fólico, C: deficiente en vitamina B<sub>12</sub> y D: grupo Control. Terminado el período de alimentación las ratas se sacrificaron por dislocación cervical para evaluar la reactividad vascular endotelio dependiente en segmentos de aorta torácica. Se tomaron muestras de sangre para determinación sérica de homocisteína, folato y vitamina B<sub>12</sub>. Los resultados se analizaron mediante estudios de comparación múltiple (Análisis de varianza y análisis de varianza para series repetidas).

**Resultados:** Los niveles séricos de folato fueron significativamente más bajos en los grupos deficientes (grupo A y B) al compararlos con los suplementados (grupo C y D) ( $p < 0,0001$ ). Los niveles séricos de vitamina B<sub>12</sub> fueron significativamente más bajos en los grupos deficientes (grupo A y C) en comparación con los grupos suplementados (grupo B y D) ( $p < 0,0001$ ). Los niveles de homocisteína fueron diferentes entre los grupos ( $p < 0,0001$ ). El estudio de reactividad vascular endotelio dependiente demostró que los anillos aórticos de los 4 grupos de ratas, se relajaban en forma similar, al igual que la respuesta endotelio independiente.

**Conclusión:** Este estudio no avala la deficiencia de folato o la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo de enfermedad cardiovascular en animales.

## SUMMARY

During the last few years, certain functions of folic acid related to cardiovascular health and to the development of tumor diseases in individuals have been identified and studied. The consumption of this vitamin produces a reduction of the homocysteine blood level. This is an amino acid which is associated to a risk factor in cardiovascular diseases. Nevertheless, recent researches suggest that the hyperhomocysteinemia is just a marker of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> deficiency. As a result, it has been proposed that the lack of these vitamins could have a causal effect in the development of cardiovascular diseases. The main culprit of this situation could be folic acid, due to its antioxidant properties and its direct participation in methylation processes.

The aim of this study was to prove, using an animal model, that folic acid deficiency, independently of the homocysteine levels, alters the endothelial dependent vascular reactivity.

**Methodology:** The research comprehended the study of 48 Wistar male rats, which were divided into 4 groups according the type of food they received during 8 weeks. A.: deficient in folic acid and vitamin B<sub>12</sub>; B: deficient in folic acid; C: deficient in vitamin B<sub>12</sub>; D: Control group. Once the feeding period finished, the rats were put down by cervical dislocation in order to evaluate the endothelial dependent vascular reactivity in segments of the thoracic aorta. Blood samples were taken to determine levels of homocysteine, folate and vitamin B<sub>12</sub>. The results were analysed through comparative studies (Anova and Anova for repeated series).

**Results:** Serum levels of folate were significantly lower than in the deficient groups (group A and B) when comparing them to the supplements (group C and D) ( $p < 0.0001$ ). The serum levels of vitamin B<sub>12</sub> were significantly lower than in the deficient groups (group A and C) when comparing them to the supplements (group B and D) ( $p < 0.0001$ ). The homocysteine levels were different between the groups ( $p < 0.0001$ ). The endothelial dependent vascular reactivity study proved that the aortic rings in the 4 groups of rats relaxed in a similar way, in the same as the endothelial independent response.

**Conclusion:** This study did not find that folate deficiency or hyperhomocysteinemia was a risk factor in cardiovascular diseases in animals.



## INTRODUCCIÓN

El ácido fólico, también llamado folato, es una vitamina del complejo B. Participa en procesos de metilación del organismo. La deficiencia de ácido fólico aumenta los niveles de homocisteína, debido a que disminuye la vía de remetilación de homocisteína a metionina.

El ácido fólico al igual que otras vitaminas del complejo B, como la vitamina B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, son necesarias para la remetilación y transulfuración de la homocisteína. Es por esto, que la deficiencia de alguna de estas vitaminas llevará a un aumento de los niveles de homocisteína en sangre.

Numerosos estudios han descrito una asociación entre aumento de la concentración sérica de homocisteína, baja concentración de folato sérico y enfermedad cardiovascular. La gran mayoría de estos estudios, han sido interpretados como que el estatus dietario del folato aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular debido al aumento de los niveles de homocisteína. Sin embargo, en la actualidad se discute su causalidad en la génesis de enfermedad cardiovascular, debido a que existen evidencias en la literatura que demuestran una asociación entre enfermedad coronaria o vascular periférica y bajos niveles séricos de folato, independiente de los niveles sanguíneos de homocisteína.

Algunos autores han demostrado que la suplementación con folato, mejora la reactividad vascular en animales de experimentación y en humanos, independiente de la concentración de homocisteína. Los mecanismos potenciales por los cuales el folato podría prevenir o disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular estarían mediados por una acción antioxidante, efecto directo sobre la producción o biodisponibilidad de óxido nítrico y/o alteración de los procesos de metilación.

El objetivo general de este estudio es demostrar en un modelo animal que el déficit de folato dietario disminuye la respuesta vasomotora endotelio dependiente, independiente de los valores de homocisteína plasmáticos.

Si se demuestra que existe una causalidad entre el déficit de folato y enfermedad cardiovascular, en Chile deberíamos observar una disminución paulatina y significativa de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares debido a la fortificación de la harina de trigo con ácido fólico.

## REVISION BIBLIOGRÁFICA

El ácido fólico o folato es una vitamina hidrosoluble, perteneciente al complejo B. Se encuentra extensamente en la naturaleza, principalmente en vegetales de hojas verdes, frutas, leguminosas y cereales (Voukiklaris *et al.*, 1996; Kafatos *et al.*, 1997; Kafatos *et al.*, 2000). El ácido fólico es un cofactor esencial que participa en reacciones de metilación como la formación y transferencia de una unidad de carbono a purinas y pirimidinas para la síntesis de ADN (Moat *et al.*, 2004); también juega un importante rol en procesos de regeneración de metionina (Verhaar *et al.*, 2002).

El folato se ha considerado como un nutriente clave implicado en la mantención de la salud y en la prevención de enfermedades crónicas (Stover, 2004). El estatus de folato puede ser influenciado negativamente por un inadecuado consumo de esta vitamina, polimorfismo genético o interacciones con varias drogas (Rampersaud *et al.*, 2003). La deficiencia de ácido fólico o anomalías en el metabolismo del folato durante el embarazo se asocia a un mayor riesgo de anomalías en el desarrollo, particularmente defectos de cierre del tubo neural (Verhaar *et al.*, 2002). Otras potenciales manifestaciones de deficiencia de folato incluyen el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, defectos en la síntesis de DNA, anemia macrocítica megaloblástica, desórdenes neurológicos o neuropsiquiátricos y enfermedad cardiovascular aterotrombótica (Graham, 2000; Verhaar *et al.*, 2002).

Estudios realizados en varios países (Irán, Korea, EEUU), donde se comparan los niveles sanguíneos de vitamina B<sub>12</sub> y folato, indican la prevalencia de bajos niveles de estas vitaminas (Jacques *et al.*, 1999; Selhub *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2002; Golbahar *et al.*, 2004). Esto puede deberse a variaciones geográficas, diferencias étnicas y raciales (Godbahar *et al.*, 2004), causas genéticas, diferentes estilos de vida, inadecuado consumo de vitamina B, inadecuada cocción de vegetales (cocción prolongada puede destruir hasta el 90% del contenido de ácido fólico), refrigeración de vegetales o la no implementación de planes de fortificación de los cereales con ácido fólico (Dawson *et al.*, 1994).

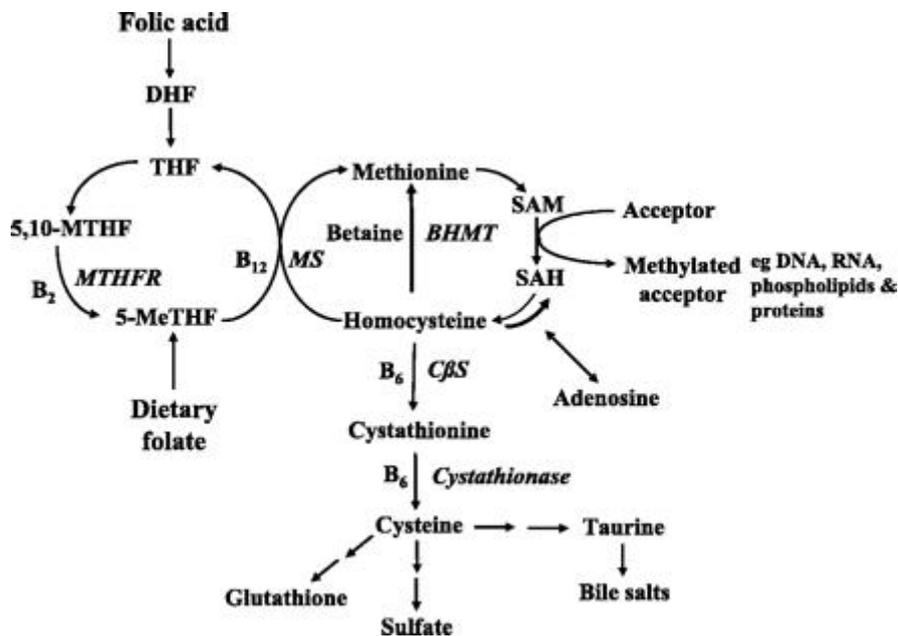
Se ha encontrado una relación inversa entre el consumo de tabaco y las concentraciones séricas de folato. Los fumadores presentan niveles menores de folato que

no fumadores. Esta asociación se ha atribuido a un menor consumo de frutas y vegetales por este grupo (Subar *et al.*, 1990).

El ácido fólico junto con la vitamina B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> (Cobalamina), son necesarias para las vías de remetilación y transulfuración de homocisteína (Verhaar *et al.*, 2002), actuando la vitamina B<sub>12</sub> como cofactor y el folato como coenzima (Lim *et al.*, 2002). Para la remetilación de la homocisteína se requiere de la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (5,10-MTHFR) y metionina sintetasa. La transulfuración es dependiente de la actividad de la enzima cistationina β-sintetasa (CBS) (Symons *et al.*, 2006). En consecuencia los niveles sanguíneos de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> están inversamente relacionados con los niveles de homocisteína (Hirsch *et al.*, 2002).

La homocisteína (Hcy) es un amino ácido no esencial que posee grupos sulfuro en su estructura. Deriva de la demetilación de un amino ácido esencial, la metionina dietaria (Chen *et al.*, 2001). La metionina es convertida a S-adenosil metionina (SAM) por la enzima metionina adenosil transferasa (Figura 1). S-adenosil metionina es demetilada a S-adenosil homocisteína (SAH), que es la única vía dadora de grupos metilos en humanos. Esta vía es esencial al proveer grupos metilos para la formación de varias biomoléculas como ADN, proteínas, fosfolípidos y neurotransmisores. SAH es hidrolizada a homocisteína en una reacción reversible, en la cual la formación de SAH es favorecida. La homocisteína puede ser remetilada a metionina por 2 vías: 1) vía enzima metionina sintetasa, que utiliza a la vitamina B<sub>12</sub> como cofactor y a 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF, forma circulante de ácido fólico) como dador de metilos, y 2) vía enzima betaína-homocisteína metiltransferasa. La homocisteína, en una vía dependiente de vitamina B<sub>6</sub>, puede ser metabolizada por la enzima cistationina β-sintetasa a cistationina, que es hidrolizada a cisteína por la enzima cistationasa, que también requiere a la vitamina B<sub>6</sub> como cofactor. La cisteína es entonces convertida a glutatión, taurina o sulfato, que posteriormente son excretados por la orina. Esta vía se utiliza en los períodos de elevado consumo de metionina o cuando los requerimientos de grupos metilos son bajos. Por el contrario, en períodos de bajo consumo de metionina y/o incremento en los requerimientos de grupos metilos, la homocisteína es remetilada a metionina (Moat *et al.*, 2004).

**Figura 1:**  
Ciclo de la homocisteína



Elevados niveles de homocisteína en el plasma (hiperhomocisteinemia) han sido relacionados con un inadecuado estatus de las vitaminas cofactores (folato, vitamina B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>), defectos genéticos en las enzimas involucradas en el metabolismo de la homocisteína (Martin *et al.*, 2003) o falla renal, entre otros (He *et al.*, 2004). La medición de homocisteína plasmática puede por lo tanto, ser útil para analizar indirectamente el estatus nutricional de estas vitaminas (Nygard *et al.*, 1998; Graham, 1999).

Elevados niveles de homocisteína plasmática se han asociado a mayor riesgo de aterosclerosis, accidente vascular encefálico, infarto al miocardio. Existen publicaciones en las cuales se ha encontrado que el 40% de los pacientes con estas patologías, presentan hiperhomocisteinemia leve o moderada (Boushey *et al.*, 1995; Clarke, 1998; Eikelboom *et al.*, 1999). Otras enfermedades que se han asociado con hiperhomocisteinemia son enfermedad de Alzheimer, deficiencia cognitiva en ancianos, malformaciones congénitas (Faraci, 2003), osteoporosis y fracturas de cadera (Selhub *et al.*, 2000; Jacobsen, 1998). La hiperhomocisteinemia también induce cambios en el ADN lo que puede resultar en defectos procarcinogénicos (Rampersaud *et al.*, 2003).

El mecanismo por el cual la homocisteína puede causar daño vascular no está claro (Doshi *et al.*, 2001). Evidencias experimentales sugieren que la homocisteína facilita el daño

arterial oxidativo, disminuye la secreción de óxido nítrico, incrementa la homocisteinización de proteínas, daña en forma directa el endotelio vascular, deteriora la regulación vasomotora endotelio dependiente, aumenta la proliferación vascular del músculo liso o altera las propiedades de la coagulación sanguínea (Welch y Loscalzo, 1998; Jakubowski *et al.*, 1999).

El endotelio es una monocapa de células que reviste por completo el árbol vascular. Juega un importante rol en la fisiología vascular con la liberación de diferentes mediadores que influyen el tono vascular, la hemostasis y la inflamación. De las sustancias liberadas por el endotelio, el óxido nítrico (NO) es la más importante en términos de mantención del tono vascular y en prevención de ateromas (Moat *et al.*, 2004).

La primera manifestación de la enfermedad aterosclerótica es la disfunción endotelial, la que se caracteriza por el deterioro de la dilatación mediada por el flujo, debido a la reducción de la biodisponibilidad de NO, ya sea debida a una mayor degradación por súper óxidos o por una menor síntesis. El NO deriva del metabolismo de L-arginina por acción de la óxido nítrico sintasa (eNOS) (Palmer *et al.*, 1988), una enzima presente en las células endoteliales (Lüscher *et al.*, 1990). La eNOS cataliza la formación de NO por incorporación de moléculas de oxígeno dentro del sustrato L-arginina, una reacción que requiere de NADPH, el activador alostérico calmodulina y varios cofactores como tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (Marletta, 1994). BH<sub>4</sub> actúa como dador de electrones oxidándose a su forma inactiva dihidrobiopterina (BH<sub>2</sub>).

Los factores de riesgo cardiovascular (dislipidemia, tabaquismo, obesidad) están asociados a una disminución de la vasodilatación endotelio dependiente. Esta alteración en la reactividad vascular endotelio dependiente es medible en humanos y en animales. En humanos se puede utilizar un método invasivo (poco utilizado), mediante la inyección de acetilcolina y posteriormente la medición de las arterias coronarias, en las cuales se observará vasodilatación si el endotelio se encuentra intacto o una vasoconstricción paradójica si el endotelio está lesionado (Ludmer *et al.*, 1986). También se puede medir por medio de un método no invasivo, utilizando ultrasonido. Se mide la dilatación de la arteria braquial después de la realización de un torniquete (Sorensen *et al.*, 1995). En animales la medición de la función endotelial se realiza por un método invasivo en el cual se mide la

respuesta vasodilatadora de un segmento aórtico a dosis sucesivas y acumulativas de acetilcolina (Symons *et al.*, 2006).

En monos y humanos se ha observado una disminución de la función endotelial, endotelio dependiente después de una hiperhomocisteinemia inducida por la dieta (Lentz *et al.*, 1996; Bellamy *et al.*, 1998).

Un aumento en los niveles de homocisteína han sido relacionadas clínicamente con enfermedad cardíaca coronaria y numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que elevaciones de los niveles de homocisteína inducen disfunción o daño endotelial (Wall *et al.*, 1980; Lentz *et al.*, 1996; Chambers *et al.*, 2001). El mecanismo por el cual la Hcy altera la función endotelial es debido al efecto dañino que ejerce la homocisteína en el endotelio por medio de mecanismos que involucran especies de oxígeno reactivo (Loscalzo, 1996). La homocisteína contiene un grupo sulfhidrilo libre que cuando se oxida a disulfido produce aniones superóxidos y peróxidos de hidrógeno (Starkebaum *et al.*, 1986; Nappo *et al.*, 1999).

Estudios epidemiológicos parecen apoyar una relación entre el estatus de folato dietario y enfermedad vascular aterotrombótica (Hu *et al.*, 2001). Pruebas realizadas en forma controlada han demostrado que el tratamiento con folato dietario natural o con ácido fólico sintético reduce significativamente los niveles plasmáticos de homocisteína (Hirsch *et al.*, 2002; Moat *et al.*, 2004). Este efecto en la disminución de la homocisteína puede ser explicada porque el folato participa como sustrato en la remetilación de homocisteína a metionina (Verhaar *et al.*, 2002).

Sin embargo, no se sabe si la hiperhomocisteinemia es un marcador o es la causa de las alteraciones cardiovasculares, debido a que, estudios más recientes han comprobado que la hiperhomocisteinemia no está asociada con cambios en la reactividad vascular endotelio dependiente o con estrés oxidativo, en adultos jóvenes y mayores sanos que presentan altas concentraciones séricas de folato, pero bajos niveles de vitamina B<sub>12</sub> (Hirsch *et al.*, 2004). Otros estudios han demostrado que existe una asociación entre función vascular e hiperhomocisteinemia en ancianos (Chao *et al.*, 2000; Hirsch *et al.*, 2002), o cuando existe deficiencia de folato, pero no de vitamina B<sub>12</sub> (Selhub *et al.*, 1995). Por otra parte, otros autores no han demostrado una asociación entre reactividad vascular

endotelio dependiente e hiperhomocisteinemia en individuos sin otros factores de riesgo cardiovascular, medida por acetilcolina (Hanratty *et al.*, 1998) y por ultrasonido en voluntarios sanos sin deficiencia de folato normal (Hirsch *et al.*, 2004).

Aunque la mayoría de los estudios publicados avalan la teoría de que la deficiencia de ácido fólico aumenta el riesgo cardiovascular debido al aumento en los niveles de homocisteína, ha surgido el debate acerca si el agente causante de la alteración de la reactividad vascular sería la hiperhomocisteinemia, la deficiencia de ácido fólico o una combinación de ambas. En el último tiempo se han ido sumando evidencias que demuestran una relación entre niveles de folato sérico y aumento del riesgo cardiovascular, independiente de los niveles de homocisteína (Silberberg *et al.*, 2001; Moat *et al.*, 2004). Se ha descrito en pacientes con enfermedad vascular periférica concentraciones séricas de folato más bajas que sus controles, aún con valores similares de homocisteína (Bunout *et al.*, 2000).

La deficiencia de folato puede ser la causa primaria del incremento del riesgo de enfermedad vascular y la hiperhomocisteinemia sólo un marcador del bajo estatus de folato (Verhaar *et al.*, 2002).

Algunos investigadores han demostrado que la administración de ácido fólico mejora la disfunción endotelial en pacientes con enfermedad cardiovascular, en presencia (Chambres *et al.*, 2000; Title *et al.*, 2000; Doshi *et al.*, 2001) o ausencia (Wilmink *et al.*, 2000; Doshi *et al.*, 2001) de un descenso en los niveles de homocisteína. Estos estudios sugieren una acción benéfica directa del ácido fólico en la función vascular.

En una serie de experimentos *in vitro*, se ha demostrado que el folato posee acción antioxidante. Se observó que 5-MTHF puede reducir la generación de superóxidos generados por el sistema xantina oxidasa/hipoxantina a través de un aumento de la óxido nítrico sintasa (Verhaar *et al.*, 1998). Otros autores han mostrado que el ácido fólico anula el incremento de superóxidos endoteliales inducidos por la homocisteína (Doshi *et al.*, 2001).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son susceptibles a ser oxidadas por las células de la pared vascular, lo que contribuye al inicio de la disfunción endotelial (Witzum

*et al.*, 1991; Sparrow *et al.*, 1993). La oxidación de LDL transforma estas lipoproteínas en partículas más aterogénicas con propiedades vasomotoras y trombogénicas, favoreciendo la llegada y la progresión de las placas de ateromas (Sevanian *et al.*, 1999). Esta condición es clave en el proceso de aterogénesis (Olszewski *et al.*, 1993). Este mecanismo asociado con la disfunción endotelial inducida por la homocisteína es probablemente mediado por el estrés oxidativo, el cual es muy importante en el incremento de los niveles de oxidación de LDL (Olszewski *et al.*, 1993; Ventura *et al.*, 2000). Ronco y cols, observaron que el 5-metil tetrahidrofolato (5-MTHF) protege a las LDL de modificaciones oxidativas *in vitro* (Ronco *et al.*, 2005). En humanos se ha descrito que la administración oral de ácido fólico prolonga el lapso de tiempo de oxidación de LDL en niños con insuficiencia renal crónica e hiperhomocisteinemia (Durand *et al.*, 1996). Además, modelos en ratas deficientes de ácido fólico aumentan la lipoperoxidación y disminuyen la capacidad antioxidante de las células (Durand *et al.*, 1996). Este efecto protector de 5-MTHF sobre las modificaciones oxidativas de LDL, es independiente de las concentraciones de homocisteína (Ronco *et al.*, 2005).

Por otra parte, el metabolito celular SAM, proveniente de la metabolización de la metionina dietaria, es un protector celular debido a que reduciría el estrés oxidativo en los sistemas biológicos. Los mecanismos de protección son por acción directa o como precursor de glutatión, un antioxidante celular (Lu, 2000). En ratas, la administración de SAM inhibe la lipoperoxidación cerebral (Villalobos *et al.*, 2000), mejora la función hepática y reduce el estrés oxidativo mitocondrial en hígado (González-Correa *et al.*, 1997). También se ha observado que en anillos aórticos de rata, SAM disminuye significativamente la lipoperoxidación vascular (De la Cruz *et al.*, 1997). Es por este motivo que la disminución de SAM producto del déficit de ácido fólico, podría aumentar el estrés oxidativo en los sistemas celulares, considerando que las condiciones de disminución de la oxidación de LDL pueden ser relacionadas con un mejoramiento de la función endotelial (Ronco *et al.*, 2005).

Por otra parte, se ha demostrado que la administración intra-arterial de 5,10-metiltetrahidrofolato y la suplementación oral con ácido fólico puede reestablecer la función endotelial en pacientes con hipercolesterolemia pero con niveles plasmáticos de homocisteína normales (Verhaar *et al.*, 1998; Verhaar *et al.*, 1999).

Recientemente se publicó un estudio en ratas donde se demuestra que sólo hiperhomocisteinemia, sumada a deficiencia de ácido fólico disminuye la reactividad vascular (Symons *et al.*, 2006).

Un mecanismo propuesto es que, 5-MTHF, forma activa de ácido fólico, incrementa la producción de óxido nítrico, reduce la producción de superóxidos y busca directamente aniones superóxidos (Stroes *et al.*, 2000). Por lo tanto, una disminución crítica de folato puede deteriorar la biodisponibilidad de óxido nítrico vía disminución de la producción y/o incremento en la inactivación de esta importante molécula vasoactiva antiaterosclerótica (Lokk, 2003). Estas observaciones sugieren que altas dosis de ácido fólico tienen otra acción farmacológica independiente del efecto sobre los niveles de homocisteína plasmática.

Estudios recientes han demostrado que bajo ciertas condiciones fisiopatológicas, la óxido nítrico sintetasa puede cambiar la síntesis de óxido nítrico a la producción de súper óxidos (Pritchard *et al.*, 1995; Stroes *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 1998), proceso llamado desacoplamiento. Se ha descrito que  $BH_4$  reduce la producción de superóxidos por eNOS *in vitro* (Stroes *et al.*, 1998; Vásquez-Vivar *et al.*, 1998) y mejora la disponibilidad de NO *in vivo* (Tiefenbacher *et al.*, 1996; Stroes *et al.*, 1997), restaurando el desacoplamiento de eNOS. En una reciente serie de experimentos *in vitro* se encontró que 5-MTHF reduce la generación de superóxidos e incrementa la síntesis de NO (Stroes *et al.*, 2000). El mecanismo exacto por el cual el ácido fólico puede interactuar con el incremento en la biodisponibilidad de NO no se conoce. Sin embargo, podría estar involucrado en la estabilización química de  $BH_4$ , regeneración de  $BH_4$  desde  $BH_2$  e interacción directa de 5-MTHF para imitar a  $BH_4$  (Moat *et al.*, 2004). En efecto, la suplementación con altas dosis de ácido fólico producen mejoría clínica en niños con deficiencia de  $BH_4$  (Smith *et al.*, 1985). También se ha observado en pacientes hipercolesterolémicos que la administración de  $BH_4$ , puede restaurar la actividad del NO (Verhaar *et al.*, 1998). *In vitro*, se demostró que el folato puede estimular la regeneración de  $BH_4$  a partir de  $BH_2$  y así aumentar la formación de NO (Doshi *et al.*, 2004).

El ácido fólico posee un acentuado efecto benéfico en las fases tempranas de la aterogénesis, sin embargo, no se observa ningún beneficio en estados más avanzados, dada la reducida expresión de eNOS en aterosclerosis más avanzadas (Oemar *et al.*, 1998). En

efecto, solo un pequeño mejoramiento de la función endotelial ha sido observado después de la suplementación con folato en aterosclerosis coronaria (Title *et al.*, 2000).

Más aún, se ha descrito que la suplementación con grandes dosis de esta vitamina podría tener un efecto paradójico en prevención secundaria, aumentando el riesgo de reestenosis en pacientes coronarios tratados con Stent (Lange *et al.*, 2004; Hankey *et al.*, 2005). También se observó que el ácido fólico sólo es efectivo, disminuyendo el grado de reestenosis, en pacientes mujeres, diabéticos o hiperhomocisteinémicos (Lange *et al.*, 2004).

La fuerte evidencia del rol protector del ácido fólico obligó a las autoridades a realizar estrategias de intervención. En 1996, la FDA (“Food and Drug Administration”) en Estados Unidos determinó que todos los cereales deberían ser enriquecidos con ácido fólico y desde enero de 1998 es obligatoria la fortificación de la harina de planificación que se consume en ese país (FDA, 1996). El programa de fortificación de la harina de trigo, ordenada por el Ministerio de Salud se llevó a cabo en nuestro país a partir del año 2000.

Si se demuestra que existe una causalidad entre el déficit de folato y enfermedades cardiovasculares, en Chile deberíamos observar una disminución paulatina y significativa de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares debido a la fortificación de la harina de trigo. Los resultados hasta la fecha han demostrado que los niveles de folato sérico han aumentado al doble en los chilenos (Hirsch *et al.*, 2002).

## **HIPÓTESIS**

La respuesta vasodilatadora endotelio dependiente disminuye en ratas con hiperhomocisteinemia secundaria a deficiencia de ácido fólico.

## **OBJETIVO GENERAL**

Demostrar en un modelo animal que la deficiencia de ácido fólico, independiente de los niveles de homocisteína, altera la respuesta vasomotora endotelio dependiente.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Provocar deficiencia de ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub> y de ambas vitaminas en un modelo animal
- Comparar la respuesta vasodilatadora endotelio dependiente en ratas hiperhomocisteinémicas, secundaria a deficiencia de ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub> o ambas.
- Demostrar en un modelo animal que hiperhomocisteinemia es un marcador de deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> y/o ácido fólico
- Demostrar en un modelo animal que hiperhomocisteinemia, secundaria a deficiencia de ácido fólico, altera la reactividad vascular endotelio dependiente.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En el Bioterio del INTA (Universidad de Chile), que cuenta con un medio ambiente controlado, temperatura de 21°C y 13 horas de luz diarias (desde 8:00 a 21:00 hrs), se cruzaron 116 ratas Wistar hembras con 73 machos del mismo tipo, en forma desfasada, semanalmente, desde el 3 de Noviembre de 2005 hasta al 18 de Enero de 2006 (tabla 1), de acuerdo a la calendarización de los experimentos (6/03/2006 al 22/05/2006). De estas cruza, 27 hembras quedaron preñadas y nacieron 112 machos. Del total de las crías machos se seleccionaron 6-7 machos por semana (los más grandes). Durante los primeros 21 días las crías permanecieron con sus madres para lactancia. El día 21 se separaron de la madre y comenzaron una alimentación completa con “pellet” comercial (alimento extruído para rata de laboratorio fabricado por Champion) durante 24 días hasta llegar a la adultez. Al cumplir 45 días de vida se seleccionaron 48 ratas (4 por semana) con un peso entre 155 g y 210 g.

Los machos seleccionados se cambiaron a jaulas individuales, se identificaron con un número en la base de la cola, e ingresaron a un programa de alimentación normal, restringida en ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub> o en ambas vitaminas, por un período de 8 semanas.

**Tabla 1:**

**Calendario estimativo al día de sacrificio**

S	Cruza	Parto	Destete	Fin dieta “Pellet”	8 Semanas Dieta	Sacrificio
1	04/11/05	25/11/05	15/12/05	08/01/06	09/01/06-5/03/06	06/03/06
2	12/11/05	03/12/05	23/12/05	15/01/06	16/01/06-12/03/06	13/03/06
3	19/11/05	10/12/05	30/12/05	22/01/06	23/01/06-19/03/06	20/03/06
4	26/11/05	17/12/05	06/01/06	29/01/06	30/01/06-26/03/06	27/03/06
5	02/12/05	23/12/05	13/01/06	05/02/06	06/02/06-2/04/06	03/04/06
6	07/12/05	28/12/05	19/01/06	12/02/06	13/02/06-9/04/06	10/04/06
7	15/12/05	05/01/06	26/01/06	19/02/06	20/02/06-16/04/06	17/04/06
8	22/12/05	12/01/06	02/02/06	26/02/06	27/02/06-23/04/06	24/04/06
9	29/12/05	19/01/06	09/02/06	05/03/06	06/03/06-30/04/06	01/05/06
10	05/01/06	26/01/06	16/02/06	12/03/06	13/03/06-7/05/06	08/05/06
11	12/01/06	02/02/06	23/02/06	19/03/06	20/03/06-14/05/06	15/05/06
12	19/01/06	09/02/06	02/03/06	26/03/06	27/03/06-21/05/06	22/05/06

Cada semana a partir del 9 de Enero hasta el 27 de marzo de 2006 (12 semanas), ingresó un macho a cada grupo (4 ratas), de acuerdo al tipo de alimentación:

- 1.- Grupo A: Deficiente en Vitamina B<sub>12</sub> y Ácido Fólico. Alimentados con una dieta artificial, importada, carente en vitamina B<sub>12</sub> y ácido fólico.
- 2.- Grupo B: Deficiente en Ácido Fólico. Alimentados con una dieta artificial, importada, carente en vitamina B<sub>12</sub> y ácido fólico. Se agregó cobalamina al agua de bebida en una dosis de 50 ug/Kg de Dieta, requerimientos necesarios para la especie.
- 3.- Grupo C: Deficiente en Vitamina B<sub>12</sub>. Alimentados con una dieta artificial, importada, carente en vitamina B<sub>12</sub> y ácido fólico. Se agregó ácido fólico en el agua de bebida en una concentración de 8 mg/Kg de Dieta, requerimientos necesarios para la especie.
- 4.- Grupo D: Control. Alimentados con la dieta chow, que simula una fortificación de folato y vitamina B<sub>12</sub>.

Se utilizó la dieta “Vitamin Mix For AIN-76<sup>a</sup> Rodent Diet Without Added Folate or Cyanocobalamin”, de “Research Diets”, para los grupos 1, 2 y 3 y “Modified AIN-76<sup>a</sup> Rodent Diet No Added Folate or Vitamin B<sub>12</sub>”, de “Research Diets”, para el grupo control.

Se controló el peso de las ratas cada semana durante las 8 semanas de alimentación restrictiva.

Una vez terminadas las 8 semanas de alimentación con dieta restrictiva en ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub> o en ambas vitaminas y con un peso de 500g aproximadamente, las ratas fueron llevadas a la Facultad de Medicina Norte (Universidad de Chile), Departamento de Farmacología donde se determinó la reactividad vascular caracterizando la función endotelial de segmentos de aorta torácica de ratas, mediante la evaluación de la relajación dependiente de endotelio y no dependiente de endotelio.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se procedió a abrir el abdomen y el tórax para extraer sangre de la vena aorta abdominal para determinación sérica de homocisteína, vitamina B<sub>12</sub> y ácido fólico. Posteriormente, se obtuvo un segmento

de aorta torácica, y se colocó en una placa Petri que contenía una solución de “Tyrode” burbujeada con CO<sub>2</sub> 5%, O<sub>2</sub> 95%, a 37° C. Se disecó cuidadosamente el vaso con el fin de eliminar toda la grasa periarterial, hasta la adventicia y se cortó un anillo de un tamaño aproximado de 5 mm. El anillo aórtico fue montado en dos ganchos de acero inoxidable e introducido en un baño de órganos de 25 ml con solución de “Tyrode” oxigenada y mantenida 37° C (pH 7,4). Uno de los ganchos fue fijado al fondo del baño y el otro a un transductor Grass de tensión isométrica (FT-1) conectado a un polígrafo Gilson de inscripción directa.

La solución de “Tyrode” modificada tenía la siguiente composición milimolar (mM): NaCl 119,7; KCl 5,4; CaCl<sub>2</sub> 2,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,2; NAHCO<sub>3</sub> 23,8; glucosa 11,1. Al ser aireada con la mezcla de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95%/5%), el pH fue de 7,4 ± 0,05.

Los anillos arteriales fueron sometidos a una tensión de reposo de 1,5 g obtenida mediante el ajuste de un microtornillo en la montura del transductor de fuerza y equilibrados durante 1 hora, cambiando la solución del baño cada 15 minutos. Finalizado el período de estabilización, se registraron dos contracciones inducidas por despolarización con K<sup>+</sup>, cambiando la solución de Tyrode por una solución de 70 mM de K<sup>+</sup> obtenida reemplazando NaCl (66,3 mM) por KCl (104,4 mM). La contracción máxima inducida por K<sup>+</sup> fue considerada como contracción de referencia.

Posteriormente, la aorta fue contraída mediante una concentración de 10<sup>-4</sup> M de noradrenalina (NA) en el baño y se efectuó una curva dosis-respuesta de relajación, añadiendo acetilcolina (ACh) en concentraciones logarítmicas acumulativas de 10<sup>-9</sup>, 3 x 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 3 x 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 3 x 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-6</sup> M. Después de haber alcanzado la respuesta máxima con una concentración, se aplicó la concentración sucesiva. Después del efecto de 10<sup>-6</sup> M de ACh, se registró la relajación máxima independiente de endotelio mediante el agregado de 10<sup>-4</sup> M de nitroprusiato de sodio. Finalizado el experimento, los anillos aórticos fueron desmontados del baño y pesados en una balanza analítica con el fin de obtener el peso húmedo para normalizar los valores equilibrados durante 1 hora.

Para la medición de los niveles séricos de la homocisteína y las vitaminas se utilizaron los siguientes métodos:

- Homocisteína (Hcy): Mediante la metodología de captura iónica, con un kit del laboratorio Abbott (IMx homocisteína Assay, Laboratorio Abbott, División Diagnóstica, Abbott park).
- Vitamina B<sub>12</sub>: Mediante inmunoensayo competitivo con un kit (“Immulite”) del Laboratorio DPC (“Diagnostic Products Corporation”), Los Ángeles CA.
- Folato Sérico: Mediante inmunoensayo competitivo con un kit (“Immulite”) del Laboratorio DPC (“Diagnostic Products Corporation”), Los Ángeles CA.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las variables analizadas en el presente estudio son las siguientes:

- 1.- Peso de las ratas
- 2.- Concentración sérica de homocisteína
- 3.- Concentración sérica de folato
- 4.- Concentración sérica de vitamina B<sub>12</sub>
- 5.- Anillos aórticos

Los resultados obtenidos de las variables mencionadas se analizaron principalmente en estudios de comparación múltiple. Para ello se calculó promedio y desviación estándar. Para las variables 2, 3 y 4 también se realizó análisis de varianza y *Post hoc* mediante la prueba de Scheffé con la finalidad de comparar las distintas variables entre los diferentes grupos. Los resultados obtenidos de la experimentación con anillos aórticos se analizaron mediante análisis de varianza para series repetidas.

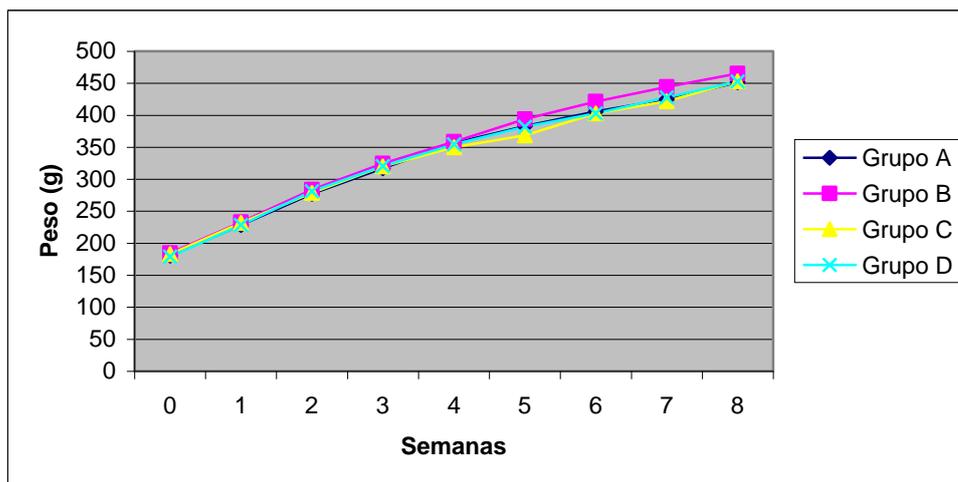
El programa utilizado para el análisis de las variables anteriormente citadas es Statistica for Windows versión 4.5 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA 1993).

## RESULTADOS

Los 12 animales ingresados a cada tratamiento finalizaron el estudio. La curva de crecimiento de las ratas fue semejante en los cuatro grupos como se muestra en la figura 2.

**Figura 2:**

**Curva de Crecimiento de las ratas de cada grupo**



Las concentraciones séricas de homocisteína, folato y vitamina B<sub>12</sub> de cada grupo se muestran en la tabla 2. Los niveles de Hcy fueron diferentes entre los grupos ( $p < 0,0001$ ). El análisis de *post hoc* mediante la prueba de Scheffé mostró que los animales controles presentaron niveles de Hcy más bajos que los deficientes en vitaminas ( $p < 0,007$ ). Los animales con deficiencia de ácido fólico y con deficiencia en ambas vitaminas exhibieron las concentraciones mayores de Hcy ( $p < 0,0001$ ), sin diferencias entre ellos. Los animales con deficiencia exclusiva de vitamina B<sub>12</sub> presentaron niveles de Hcy más altos que los controles ( $p < 0,0003$ ) y más bajos que los deficientes en folato ( $p < 0,007$ ).

Las concentraciones más bajas de folato la presentaron el grupo deficiente en ácido fólico y el deficiente en ambas vitaminas ( $p < 0,0001$ ), no encontrándose diferencias entre ellos. El grupo control presentó los niveles más altos de esta vitamina ( $p < 0,0001$ ). El grupo deficiente en vitamina B<sub>12</sub> exhibió niveles séricos de folato menores que el grupo control ( $p < 0,0001$ ), pero mayores que los grupos deficientes en ácido fólico ( $p < 0,045$ ).

Los niveles de vitamina B<sub>12</sub> fueron diferentes entre los grupos ( $p < 0,0001$ ). Los grupos con deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> presentaron niveles más bajos que el grupo control y

el grupo deficiente en folato ( $p < 0,0001$ ), sin diferencia entre ellos. Los niveles de vitamina B<sub>12</sub> en el grupo control y en el grupo con deficiencia exclusiva de ácido fólico fueron similares.

**Tabla 2:**

Valores promedios de Folato, Vitamina B<sub>12</sub>, Homocisteína y Peso en las ratas de cada grupo.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Hcy umol/L	24,26±5,09 <sup>b</sup>	22,92±3,04 <sup>b</sup>	17,34±2,65 <sup>c</sup>	10,00±3,50 <sup>a</sup>
Folato nmol/L	31,81±16,00 <sup>b</sup>	29,87±22,73 <sup>b</sup>	74,96±35,67 <sup>c</sup>	186,52±55,54 <sup>a</sup>
B <sub>12</sub> pmol/L	200,25±53,34 <sup>b</sup>	874,84±315,71 <sup>a</sup>	178,48±59,10 <sup>b</sup>	797,86±91,41 <sup>a</sup>
Peso Inicial	180,58±10,69	184,42±11,87	182,92±11,59	178,75±10,91
Peso Final	451,42±34,64	465,00±43,62	453,25±50,15	452,58±40,09

ANOVA  $p < 0,0001$ .

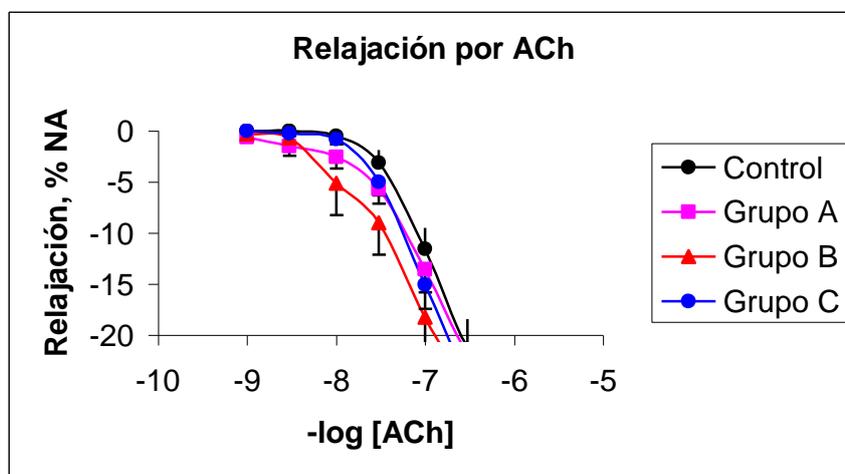
Comparación de los promedios mediante el método de Scheffé Post Hoc

a, b, c Letras diferentes entre columnas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,045$ )

El peso promedio de los anillos aórticos extraídos fue de 21,34 mg (rango 10-43,8 mg). El estudio de reactividad vascular endotelio dependiente demostró que los anillos aórticos de los 4 grupos de ratas, se relajaban en forma similar (figura 3), al igual que la respuesta endotelio independiente (figura 4).

**Figura 3:**

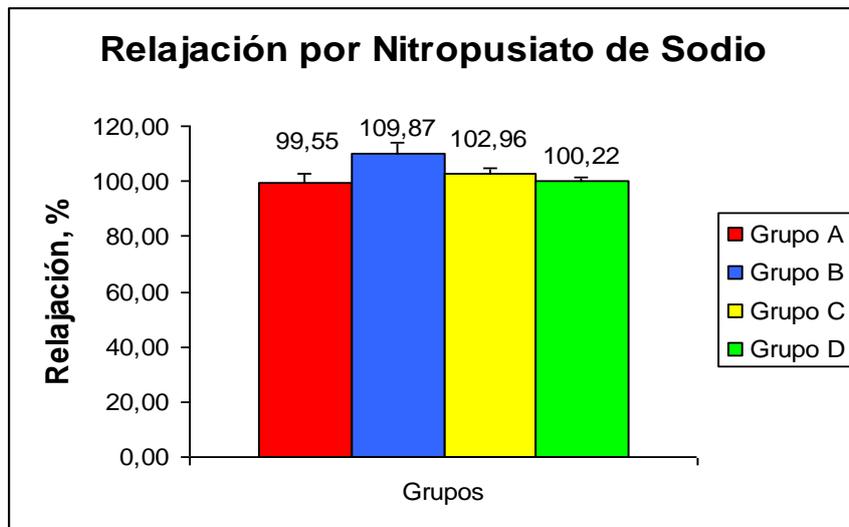
Reactividad vascular Endotelio dependiente medida por acetilcolina



ANOVA: NS

Figura 4:

Reactividad vascular Endotelio independiente medida por Nitropusiato de Sodio



## DISCUSIÓN

En este estudio se logró provocar deficiencia de ácido fólico, de vitamina B<sub>12</sub>, de ambas vitaminas e hiperhomocisteinemia. Los niveles séricos de homocisteína logrados con las distintas dietas, son similares a los obtenidos en estudios publicados con animales en semejantes condiciones dietéticas (Huang *et al.*, 2001; Symons *et al.*, 2006), asegurándose un correcto modelo experimental.

Al analizar los niveles de homocisteína de cada grupo se observó que son más altos en el grupo deficiente en ácido fólico y en ambas vitaminas, que en el grupo con deficiencia exclusiva de vitamina B<sub>12</sub>. Esta explicación estaría dada porque la vitamina B<sub>12</sub> es la encargada de convertir 5-MTHF, forma circulante de ácido fólico, en tetrahidrofolato (THF), liberando un grupo metilo que se une a la homocisteína, transformándola en metionina. Si hay deficiencia de ácido fólico se altera en forma directa el ciclo de la homocisteína, debido a que no existe un dador de grupos metilos para que la homocisteína sea remetilada a metionina. Por otra parte, si la deficiencia es de vitamina B<sub>12</sub>, se altera el paso de 5-MTHF a THF, disminuyendo el aporte de grupos metilos al ciclo de la homocisteína, alterándose el ciclo en forma indirecta, lo que lleva a un menor incremento de la Hcy (Moat *et al.*, 2004).

La cantidad de vitaminas aportada en los grupos experimentales se basó en los requerimientos descritos para la especie (NRC, 1995). La concentración de vitamina B<sub>12</sub> y folato de la dieta control fue mayor que los requerimientos. Sin embargo, los niveles séricos de vitamina B<sub>12</sub> obtenidos en el grupo deficiente en ácido fólico fueron similares a los obtenidos en el grupo control. Por el contrario, los niveles de ácido fólico obtenidos en el grupo deficiente en vitamina B<sub>12</sub> fueron significativamente más bajos que los obtenidos en el grupo control. Esto se explica porque la vitamina B<sub>12</sub> una vez ingerida requiere unirse a un factor intrínseco producido en el estómago, para formar el complejo cobalamina-factor intrínseco. Este último complejo se une a un receptor de membrana (cubilin) en los enterocitos del ileon el cual por endocitosis es procesado mediante la vía endosomal-lisosomal. La cobalamina liberada se convierte a transcobalamina que mediante vesículas secretoras transportan la vitamina por la circulación. Por lo tanto, cuando los requerimientos están cubiertos, el mecanismo de absorción se satura, impidiendo que se siga absorbiendo la vitamina (Said *et al.*, 2006).

A diferencia de la vitamina B<sub>12</sub>, el ácido fólico tiene dos formas de ser absorbido. La primera es mediada por un transportador, mecanismo activo y saturable, que se utiliza cuando existen bajas concentraciones de la vitamina. El segundo mecanismo de absorción es por difusión, pasivo y no saturable, utilizado cuando hay altas concentraciones de folato. Por lo tanto, la absorción de ácido fólico es continua, lo que explica los niveles séricos de folato más altos en el grupo control (Said *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos en este estudio son concordantes con los logrados por Devlin y cols., que midió el efecto del genotipo (disrupción del gen metiltetrahidrofolato reductasa) en la hiperhomocisteinemia inducida por deficiencia de ácido fólico y su consiguiente efecto sobre la reactividad vascular. En este estudio, el autor no observó efecto del genotipo o de la dieta en la respuesta vasomotora a acetilcolina o nitropusiato de sodio en anillos aórticos (Devlin *et al.*, 2004). Resultados semejantes obtuvo Dayal y cols., en un modelo diferente, provocando hiperhomocisteinemia en ratas con deficiencia de cistación  $\beta$ -sintetasa y con dieta con altas y bajas concentraciones de metionina (Dayal *et al.*, 2001). Por el contrario, Symons y cols., no concuerdan con nuestros resultados. En el modelo aplicado por ellos, se trabajó con cuatro grupos de animales. Dos grupos recibieron 10mg de ácido fólico/Kg dieta chow. Uno de éstos grupos consumió agua estándar y el otro consumió agua suplementada con 1% de metionina. Los otros dos grupos adicionales recibieron 0,4mg de ácido fólico/kg dieta chow. Uno de éstos grupos consumió agua estándar y el otro consumió agua suplementada con 1% de metionina. Después de 10 semanas de alimentación con las dietas respectivas se determinó la reactividad vascular usando arterias coronarias, segmentos de aortas torácicas y arterias mesentéricas. En los resultados obtenidos por el autor se observa que en arterias coronarias, aortas y arterias mesentéricas, la vasorelajación provocada por acetilcolina fue menor en el grupo con baja concentraciones de folato e hiperhomocisteinemia inducida por metionina, al compararlo con el grupo control (Symons *et al.*, 2006).

Una posible explicación de la obtención de resultados negativos podría ser que los niveles de Hcy alcanzados fueron muy bajos. Sin embargo al analizar experimentos previos, se observa que los niveles de Hcy alcanzados en el presente estudio son iguales o más altos, además de encontrar que los niveles de folato son aún más bajos que los obtenidos por los otros autores, por lo tanto esta no sería la causa (Symons *et al.*, 2006). La acción de la Hcy analizada en este estudio es producto de un efecto prolongado en el tiempo, a diferencia de

otros estudios donde se analiza un efecto agudo. Otra posibilidad es que los anillos aórticos sean insensibles a hiperhomocisteinemia inducida por deficiencia de ácido fólico, a diferencia de arteriolas cerebrales. Se ha visto que microvasos son más sensibles a hiperhomocisteinemia por deficiencia de folato (Devlin *et al.*, 2004). Otro factor podría ser el tiempo de exposición a la deficiencia de ácido fólico. Dayal y cols., no encontraron efectos del folato sobre la reactividad vascular dependiente de endotelio a las 7 semanas de alimentación con deficiencia de ácido fólico, pero sí a las 15 semanas (Dayal *et al.*, 2001). Symons y cols., al igual que el autor anterior, también encontró resultados positivos pero a las 10 semanas de alimentación (Symons *et al.*, 2006). A diferencia de los autores anteriores, Devlin y cols., encontró resultados negativos a las 7 y 15 semanas de alimentación (Devlin *et al.*, 2004).

Estos resultados también están de acuerdo con estudios en humanos recientemente publicados, donde la suplementación con ácido fólico no mejora la función vascular en voluntarios sanos. Esto sugiere que la homocisteína si es que está involucrada en las fases tempranas de la patogénesis vascular, no estaría en relación directa con la función vascular. Olthof y cols., analizaron 19 casos controlados en voluntarios sanos y enfermos cardiovasculares. De los 8 estudios realizados a voluntarios sanos, 2 encontraron un efecto positivo de la suplementación con ácido fólico, en donde con dosis de 5 mg/día de ácido fólico se mejora la función vascular. Los otros 6 estudios avalan nuestros resultados, debido a que no se encuentra mejoría de la reactividad vascular con ácido fólico. De los 11 estudios realizados en pacientes con enfermedad cardiovascular, 6 encontraron que existe mejoría de la reactividad vascular con suplementación con ácido fólico (Olthof *et al.*, 2006).

En consecuencia este estudio, no demuestra que la deficiencia de folato o la hiperhomocisteinemia inducida por deficiencia de folato y B<sub>12</sub> constituyan un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular en animales.

## CONCLUSIÓN

**I.** En este estudio se logró provocar deficiencia de ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub> y de ambas vitaminas. Se provocó hiperhomocisteinemia por deficiencia de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>, demostrándose que altas concentraciones séricas de homocisteína son sólo un marcador de deficiencia vitamínica.

**II.** En el experimento llevado a cabo no se demostró la hipótesis que la deficiencia de ácido fólico, independiente de los niveles de homocisteína, altera la respuesta vasomotora endotelio dependiente, debido a que el análisis de los anillos aórticos no reveló diferencias entre los grupos.

**III.** En este estudio se demostró que los niveles séricos de folato son dosis dependiente, a diferencia de los de B<sub>12</sub>, debido a que la ingesta sobre los requerimientos no aumenta los niveles séricos.

## BIBLIOGRAFÍA

**BELLAMY, M.F.; MCDOWELL, I.F.; RAMSEY, M.W.; BROWNLEE, M.; BONES, C.; NEWCOMBE, R.G.; LEWIS, M.J.** 1998. Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. *Circulation*. 98(18):1848-1952.

**BOUSHEY, C.J.; BERESFORD, S.A.; OMENN, G.S.; MOTULSKY, A.G.** 1995. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *J.A.M.A.* 274(13):1049-1057.

**BUNOUT, D.; PETERMANN, M.; HIRSCH, S.; DE LA MAZA, P.; SUAZO, M.; BARRERA, G.; KAUFFMAN, R.** 2000. Low serum folate but normal homocysteine levels in patients with atherosclerotic vascular disease and matched healthy controls. *Nutrition*. 16(6):434-438.

**CHAMBERS, J.C.; UELAND, P.M.; OBEID, O.A.; WRIGLEY, J.; REFSUM, H.; KOONER, J.S.** 2000. Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: an effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine. *Circulation*. 102:2479-2483.

**CHAMBERS, J.C.; UELAND, P.M.; WRIGHT, M.; DORE, C.J.; REFSUM, H.; KOONER, J.S.** 2001. Investigation of relationship between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and vascular endothelial function in healthy human subjects. *Circ. Res.* 89(2):187-192.

**CHAO, C.I.; KUO, T.L.; LEE, Y.T.** 2000. Effects of methionine-induced hyperhomocysteinemia on endothelium-dependent vasodilation and oxidative status in healthy adults. *Circulation*. 101:485-490.

**CHEN, Z.; KARAPLIS, A.C.; ACKERMAN, S.L.; POGRIBNY, I.P.; MELNYK, S.; LUSSIER-CACAN, S.; CHEN, M.F.; PAI, A.; JOHN, S.W.; SMITH, R.S.; BOTTIGLIERI, T.; BAGLEY, P.; SELHUB, J.; RUDNICKI, M.A.; JAMES, S.J.; ROZEN, R.** 2001. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum. Mol. Genet.* 10(5):433-443.

**CLARKE, R.** 1998. Homocysteine and cardiovascular disease. *J. Cardiovascular Risk*. 5:213-215.

**DAWSON, D.W.; WATERS, H.M.** 1994. Malnutrition: folate and cobalamin deficiency. *Br. J. Biomed Sci.* 51(3):221-227.

**DAYAL, S.; BOTTIGLIERI, T.; ARNING, E.; MAEDA, N.; MALINOW, M.R.; SIGMUND, C.D.; HEISTAD, D.D.; FARACI, F.M.; LENTZ, S.R.** 2001. Endothelial

dysfunction and elevation of S-Adenosylhomocysteine in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circ. Res.* 88(11):1203-1209.

**DE LA CRUZ, J.P.; GONZALEZ-CORREA, J.A.; MARTIN-AURIOLES, E.; ORTIZ, P.; SANCHEZ DE LA CUESTA, F.** 1997. Effects of S-adenosyl-L-methionine on platelet thromboxane and vascular prostacyclin. *Biochem. Pharmacol.* 53(11):1761-1763.

**DEVLIN, A.M.; ARNING, E.; BOTTIGLIERI, T.; FARACI, F.M.; ROZEN, R.; LENTZ, SR.** 2004. Effect of *Mthfr* genotype on diet-induced hyperhomocysteinemia and vascular function in mice. *Blood.* 103(7):2624-2629.

**DOSHI, S.N.; MCDOWELL, I.F.; MOAT, S.J.; LANG, D.; NEWCOMBE, R.G.; KREDAN, M.B.; LEWIS, M.J.; GOODFELLOW, J.** 2001. Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide?. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21(7):1196-1202.

**DOSHI, S.N.; MOAT, S.J.; LEWIS, M.J.; MCDOWELL, I.F.; GIDDINGS, J.C.; GOODFELLOW, J.** 2004. Short-term high-dose folic acid does not alter markers of endothelial cell damage in patients with coronary heart disease. *Int. J. Cardiol.* 94(2-3):203-207.

**DURAND, P.; PROST, M.; BLACHE, D.** 1996. Pro-thrombotic effects of a folic acid deficient diet in rat platelets and macrophages related to elevated homocysteine and decreased n-3 polyunsaturated fatty acids. *Atherosclerosis.* 121:231-243.

**EIKELBOOM, J.W.; LONN, E.; GENEST, J.JR; HANKEY, G.; YUSUF, S.** 1999. Homocysteine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann. Intern. Med.* 131(5):363-375.

**FARACI, FM.** 2003. Hyperhomocysteinemia: a million ways to lose control. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23(3):371-373.

**FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 1996. Food Standards: Amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. *Fec. Register.* 61:8781-8797.

**GOLBAHAR, J.; REZAIAN, G.; BARARPOUR, H.** 2004. Distribution of plasma total homocysteine concentrations in the healthy Iranians. *Clinical Biochemistry.* 37(2):149-151.

**GONZALEZ-CORREA, J.A.; DE LA CRUZ, J.P.; MARTIN-AURIOLES, E.; LOPEZ-EGEA, M.A.; ORTIZ, P.; SANCHEZ DE LA CUESTA, F.** 1997. Effects of S-adenosyl-L-methionine on hepatic and renal oxidative stress in an experimental model of acute biliary obstruction in rats. *Hepatology.* 26:121-127.

**GRAHAM, I.** 1999. Homocysteine in health and disease. *Annals of Internal Medicine.* 3:387-388.

**GRAHAM, I.M.; OCALLAGHAN, P.** 2000. The role of folic acid in the prevention of cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 11(6):577-587.

**HANKEY, G.J.; EIKELBOOM, J.W.** 2005. Homocysteine and stroke. *Lancet.* 365:194-196

**HANRATTY, C.G.; MCAULY, D.F.; MCGURK, C.; YOUNG, I.S. JOHNSTON, G.D.** 1998. Homocysteine and endothelial dysfunction. *Lancet.* 351:1288-1289.

**HE, K.; MERCHANT, A.; RIMM, E.B.; ROSNER, B.A.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C.; ASCHERIO, A.** 2004. Folate, vitamin B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> intakes in relation to risk of stroke among men. *Stroke.* 35(1):169-174.

**HIRSCH, S.; DE LA MAZA, P.; MENDOZA, L.; PETERMANN, M.; GLASINOVIC, A.; PAULINELLI, P.; BARRERA, G.; ROSENBERG, I.H.; BUNOUT, D.** 2002. Endothelial function in healthy younger and older hyperhomocysteinemic subjects. *J. Am. Geriatr. Soc.* 50(6):1019-1023.

**HIRSCH, S.; RONCO, A.M.; VASQUEZ, M.; DE LA MAZA, M.P.; GARRIDO, A.; BARRERA, G.; GATTAS, V.; GLASINOVIC, A.; LEIVA, L.; BUNOUT, D.** 2004. Hiperhomocysteinemia in healthy young men and elderly men with normal serum folate concentration is not associated with poor vascular reactivity or oxidative stress. *J. Nutr.* 134(7):1832-1835.

**HU, F.B.; WILLETT, W.C.** 2001. Diet and coronary heart disease: findings from the Nurses' Health Study and Health Professionals' Follow-up Study. *J. Nutr. Health. Aging.* 5(3):132-138.

**HUANG, R.F.; HSU, Y.C.; LIN, H.L.; YANG, F.L.** 2001. Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J. Nutr.* 131(1):33-38.

**JACOBSEN, D.W.;** Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. 1998. *Clin. Chem.* 44:1833-1843.

**JACQUES, P.F.; ROSENBERG, I.H.; ROGERS, G.; SELHUB, J.; BOWMAN, B.A.; GUNTER, E.W.; WRIGHT, J.D.; JOHNSON, CL.** 1999. Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am. J. Clin. Nutr.* 69(3):482-489.

**JAKUBOWSKI, H.** 1999. Protein homocysteinylation: Possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *F.A.S.E.B J.* 13(15):2277-2283.

**KAFATOS, A.; DIACATOU, A.; VOUKIKLARIS, G.; NIKOLAKAKIS, N.; VLACHONIKOLIS, J.; KOUNALI, D.; MAMALAKIS, G.; DONTAS, A.S.** 1997. Heart disease risk-factor status and dietary changes in the Cretan population over the past 30 y: the Seven Countries Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 65(6):1882-1886.

**KAFATOS, A.; VERHAGEN, H.; MOSCHANDREAS, J.; APOSTOLAKI, I.; VAN WESTEROP, J.J.** 2000. Mediterranean diet of Crete: foods and nutrient content. *J. Am. Diet. Assoc.* 100(12):1487-1493.

**LANGE, H.; SURYAPRANATA, H.; DE LUCA, G.; BORNER, C.; DILLE, J.; KALLMAYER, K.; PASALARY, M.N.; SCHERER, E.; DAMBRINK, J.H.** 2004. Folate therapy an in-stent restenosis after coronary stening. *N. Engl. J. Med.* 350(26):2673-2681.

**LENTZ, S.R.; SOBEY, C.G.; PIEGORS, D.J.; BHOPATKAR, M.Y.; FARACI, F.M.; MALINOW, M.R.; HEISTAD, D.D.** 1996. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocysteinemia. *J. Clin. Invest.* 98(1):24-29.

**LIM, H.S.; HEO, Y.R.** 2002. Plasma total homocysteine, folate, and vitamin B<sub>12</sub> status in Korean adults. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 48(4):290-297.

**LOKK, J.** 2003. News and views on folate and elderly persons. *J. Gerontol.* 58:354-361.

**LOSCALZO, J.** 1996. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *J. Clin. Invest.* 98(1):5-7.

**LU, S.C.** 2000. S-adenosylmethionine. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 32(4):391-395.

**LUDMER, P.L.; SELWYN, A.P.; SHOOK, T.L.; WAYNE, R.R.; MUDGE, G.H.; ALEXANDER, R.W.; GANZ, P.** 1986. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 315(17):1046-1051.

**LÜSCHER, T.F.; VANHOUTTE, P.M.** 1990. The endothelium: Modulator of cardiovascular function. Boca Ratón, Fla: CRC Press. 1-228.

**MARLETTA, M.A.** 1994. Nitric oxide Synthase: aspect concerning structure and catalysis. *Cell.* 78:927-930.

**MARTIN, I.; OBRADOR, A.; GIBERT, M.J.; HERNANZ, A.; FUSTER, A.; PINTOS, C.; GARCIA, A.; TUR, J.** 2003. Folate status and a new repletion cutt-off value in a group of healthy Majorcan woman. *Clin. Nutr.* 22(1):53-58.

**MOAT, S.J.; DOSHI, S.N.; LANG, D.; MCDOWELL, I.; LEWIS, M.J.; GOODFELLOW, J.** 2004. Treatment of coronary heart disease with folic acid: is there a future?. *Am. J. Physiol. Herat. Circ. Physiol.* 287(1):H1-7.

**NAPPO, F.; DE ROSA, N.; MARFELLA, R.; DE LUCIA, D.; INGROSSO, D.; PERNA, A.F.; FARZATI, B.; GIUGLIANO, D.** 1999. Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *J.A.M.A.* 281(22):2113-2118.

**NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC).** 1995. Nutrient requirements of laboratory animals. 4<sup>th</sup> ed. National Academy Press, Washington, DC.

**NYGARD, O.; REFSUM, H.; UELAND, P.M.; VOLLSET, S.E.** 1998. Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 67(2):263-270.

**OEMAR, B.S.; TSCHUDI, M.R.; GODOY, N.; BROVKOVICH, V.; MALINSKI, T.; LUSCHER, T.F.** 1998. Reduced endothelial nitric oxide Synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation.* 97:2494-2498.

**OLSZEWSKI, A.J.; MCCULLY, K.S.** 1993. Homocysteine metabolism and the oxidative modification of protein and lipids. *Free. Radic. Biol. Med.* 14(6):683-693.

**OLTHOF, M.R.; BOTS, M.L.; KATAN, M.B.; VERHOEF, P.** 2006. Effect of folic acid and betaine supplementation on flow-mediated dilation: a randomized, controlled study in healthy volunteers. *Plos. Clin. Trials.* 1(2): e10.

**PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S.** 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 333:664-666.

**PRITCHARD, K.A. JR.; GROSZEK, L.; SMALLEY, D.M.; SESSA, W.C.; WU, M.; VILLALON, P.; WOLIN, M.S.; STEMERMAN, M.B.** 1995. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ. Res.* 77(3):510-518.

**RAMPERSAUD, G.C.; KAUELL, G.P.; BAILEY, L.B.** 2003. Folate: a key to optimizing health and reducing disease risk in the elderly. *J. Am. Coll. Nutr.* 22(1):1-8.

**RONCO, A.M.; GARRIDO, A.; LLANOS, M.N.; GUERRERO-BOSAGNA, C.; TAMAYO, D.; HIRSCH, S.** 2005. Effect of homocysteine, folates, and cobalamin on endothelial cell-and cooper-induced LDL oxidation. *Lipids.* 40(3):259-264.

**SAID, H.M.; MOHAMMED, Z.M.** 2006. Intestinal absorption of water-soluble vitamins: an update. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 22(2):140-146.

**SELHUB, J.; JACQUES, P.F.; BOSTOM, A.G.; D'AGOSTINO, R.B.; WILSON, P.W.; BELANGER, A.J.; O'LEARY, D.H.; WOLF, P.A.; SCHAEFER, E.J.; ROSENBERG, I.H.** 1995. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N. Eng. J. Med.* 332:286-291.

**SELHUB, J.; JACQUES, P.F.; ROSENBERG, I.H.; ROGERS, G.; BOWMAN, B.A.; GUNTER, E.W.; WRIGHT, J.D.; JOHNSON, C.L.** 1999. Serum total homocysteine concentrations 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.* 131(5):331-339.

**SELHUB, J.; BAGLEY, L.C.; MILLER, J.; ROSENBERG, I.H.** 2000. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(2):614S-620S.

**SEVANIAN, A.; ASATRYAN, L.; ZIOUZENKOVA, O.** 1999. Low-density lipoprotein (LDL) modification: basic concepts and relationship to atherosclerosis. *Blood. Purif.* 17(2-3):66-78.

**SILBERBERG, J.S.; CROOKS, R.L.; WLODARCZYK, J.H.; FRYER, J.L.** 2001. Association between plasma folate and coronary disease independent of homocysteine. *Am. J. Cardiol.* 87:1003-1004.

**SMITH, I.; HYLAND, K.; KENDALL, B.** 1985. Clinical role of pteridine therapy in tetrahydrobiopterin deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 8 Suppl 1:39-45.

**SORENSEN, K.E.; CELERMAJER, D.S.; SPIEGELHALTER, D.J.** 1995. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: Accuracy and reproducibility. *Br. Heart. J.* 6:67-75.

**SPARROW, C.P.; OLSZEWSKI, A.** 1993. Cellular oxidation of low density lipoprotein is caused by thiol production in media containing transition metals ions. *J. Lipid. Res.* 3:1219-1228.

**STARKEBAUM, G.; HARLAN, J.M.** 1986. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J. Clin. Invest.* 77(4):1370-1376.

**STOVER, P.J.** 2004. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr. Rev.* 62(6):S3-S13.

**STROES, E.; KASTELEIN, J.; COSENTINO, F.; ERKELENS, W.; WEVER, R.; KOOMANS, H.; LUSCHER, T.; RABELINK, T.** 1997. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.* 99(1):41-46.

**STROES, E.; HIJMERING, M.; VAN ZANDVOORT, M.; WEVER, R.; RABELINK, T.J.; VAN FAASSEN, E.E.** 1998. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide Synthase. *FEBS Lett.* 438(3):161-164.

**STROES, E.S.; VAN FAASSEN, E.E.; YO, M.; MARTASEK, P.; BOER, P.; GOVERS, R.; RABELINK, T.J.** 2000. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res.* 86(11):1129-1134.

**SUBAR, A.F.; HARLAN, L.C.; MATTSON, M.E.** 1990. Food and nutrient intake differences between smokers and non-smokers in the US. *Am. J. Public. Health.* 80(11):1323-1329.

**SYMONS, J.D.; RUTLEDGE, J.C.; SIMONSEN, U.; PATTATHU, R.A.** 2006. Vascular dysfunction produced by hyperhomocysteinemia is more severe in the presence of low folate. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 290:H181-191.

**TIEFENBACHER, C.P.; CHILIAN, W.M.; MITCHELL, M.; DEFILY, D.V.** 1996. Restoration of endothelium-dependent vasodilation after reperfusion injury by tetrahydrobiopterin. *Circulation.* 94:1423-1429.

**TITLE, L.M.; CUMMINGS, P.M.; GIDDENS, K.; GENEST, J.J. JR.; NASSAR, B.A.** 2000. Effect of folic acid and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36(3):758-765.

**VASQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B.; MARTASEK, P.; HOGG, N.; MASTERS, B.S.; KAROUI, H.; TORDO, P.; PRITCHARD, K.A JR.** 1998. Superoxide generation by endothelial nitric oxide Synthase: the influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(16):9220-9225.

**VENTURA, P.; PANINI, R.; VERLATO, C.; SCARPETTA, G.; SALVIOLI, G.** 2000. Peroxidation indices and total antioxidant capacity in plasma during hyperhomocysteinemia induced by methionine oral loading. *Metabolism.* 49(2):225-228.

**VERHAAR, M.C.; WEVER, R.M.; KASTELEIN, J.J.; VAN DAM, T.; KOOMANS, H.A.; RABELINK, T.J.** 1998. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation.* 97:237-241.

**VERHAAR, M.C.; WEVER, R.M.; KASTELEIN, J.J.; VAN LOON, D.; MILSTIEN, S.; KOOMANS, H.A.; RABELINK, T.J.** 1999. Effects of oral folic acid supplementation on endothelial function in familial hypercholesterolemia: a randomized placebo-controlled trial. *Circulation*. 100:335-338.

**VERHAAR, M.C.; STROES, E.; RABELINK, T.J.** 2002. Folates and Cardiovascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22:6-13.

**VILLALOBOS, M.A.; DE LA CRUZ, J.P.; CUERDA, M.A., ORTIZ, P.; SMITH-AGREDA, J.M.; SANCHEZ DE LA CUESTA, F.** 2000. Effect of S-adenosyl-L-methionine on rat brain oxidative stress damage in a combined model of permanent focal ischemia and global ischemia-reperfusion. *Brain. Res.* 883(1):31-40.

**VOUKIKLARIS, G.E.; KAFATOS, A.G.; DONTAS, A.S.** 1996. Changing prevalence of coronary heart disease risk factors and cardiovascular diseases in men of a rural area of Crete from 1960 to 1991. *Angiology*. 47(1):43-49.

**WALL, R.T.; HARLAN, J.M.; HARKER, L.A.; STRIKER, G.E.** 1980. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of a vascular injury. *Thromb. Res.* 18(1-2):113-121.

**WELCH, G.N.; LOSCALZO, J.** 1998. Homocysteine and atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.* 338(15):1042-1050.

**WILMINK, H.W.; STROES, E.S.; ERKELENS, W.D.; GERRITSEN, W.B.; WEVER, R.; BANGA, J.D.; RABELINK, T.J.** 2000. Influence of folic acid on postprandial endothelial dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20(1):185-188.

**WITZUM, J.L.; STEINBERG, D.** 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 88(6):1785-1792.

**XIA, Y.; TSAI, A.L.; BERKA, V.; ZWEIER, J.L.** 1998. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J. Biol. Chem.* 273(40):25804-25808.