

# Caracterización de un modelo murino en el que la deficiencia parcial de folato no induce hiperhomocisteinemia

L. Calpe-Berdiel, J.C. Escolà-Gil, V. Ribas, R. Arcelus y F. Blanco-Vaca

Servei de Bioquímica i Institut de Recerca. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

---

*Introducción y objetivos.* El posible papel de los folatos en la prevención de enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas es un tema de actualidad. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado una asociación inversa entre los valores de esta vitamina en sangre y la morbimortalidad cardiovascular o la enfermedad de Alzheimer. Múltiples estudios han constatado los efectos hipohomocisteinmiantes del folato. Recientemente se han descrito efectos beneficiosos del folato en el endotelio que son homocisteína-independientes. Para evaluar su potencial relevancia fisiopatológica se requiere que haya modelos en que los que se pueda disociar hiperhomocisteinemia y deficiencia de folato.

*Material y métodos.* Estudio histológico y morfométrico de las lesiones arterioscleróticas en ratones C57BL/6 alimentados con dieta Western (una dieta con un alto contenido en grasas saturadas) deficiente o no en folatos.

*Resultados.* Los animales con déficit vitamínico de folato no presentaron hiperhomocisteinemia. Tampoco presentaron diferencias en la glucosa ni en los parámetros lipídicos, hematológicos o la función renal. La deficiencia en folatos no aumentó el área ( $5.310 \pm 1.346$  frente a  $4522 \pm$

$1276 \text{ mm}^2$  en el grupo control) ni el número de lesiones arterioscleróticas ( $1,4 \pm 0,3$  frente a  $2,0 \pm 0,5$  en el grupo control).

*Conclusiones.* El ratón es un buen modelo para diferenciar los efectos debidos a déficit de folato de los ocasionados por hiperhomocisteinemia, un binomio que suele ser inseparable en humanos. La deficiencia de folato, en ausencia de hiperhomocisteinemia, no incrementa la magnitud ni el número de lesiones arterioscleróticas en el ratón.

*Palabras clave:*

Deficiencia de folato. Arteriosclerosis. Vitaminas B. Homocisteína.

---

## CHARACTERIZATION OF A RODENT MODEL IN WHICH PARTIAL FOLATE DEFICIENCY DOES NOT INDUCE HYPERHOMOCISTEINEMIA

*Introduction and objectives.* The potential role of folates in the prevention of cardiovascular and neurodegenerative diseases is a topic of current interest. Several studies have showed an association between these vitamin levels and cardiovascular and Alzheimer morbidity and/or mortality. Many studies have demonstrated the homocysteine-lowering effects of folates. It has recently been demonstrated that folates have homocysteine-independent protective actions at endothelial level. To evaluate their pathophysiological significance, models are required in which folate deficiency and hyperhomocysteinemia can be dissociated.

*Material and methods.* Histologic and morphometric study of aortic atherosclerosis was

---

Este estudio ha sido financiado en parte gracias a becas de la Fundació la Marató de TV3 003410 y FIS C03-08 (a FBV). J.C. Escolà es un investigador del programa Ramón y Cajal, del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Correspondencia: Dr. Francisco Blanco Vaca.  
Servei de Bioquímica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.  
Sant Antoni M. Claret, 167. 08025 Barcelona. España.  
Correo electrónico: fblancova@hsp.santpau.es

Recibido el 13 de noviembre de 2003 y aceptado el 17 de mayo de 2004.

conducted in C57BL/6 mice fed a Western type diet (rich in saturated fat) containing or not folates.

**Results.** Animals with vitamin deficiency did not present hyperhomocysteinemia. No changes were observed in lipid profile, glucose or hematological and renal function parameters. Folate deficiency did not increase either the size ( $5310 \pm 1346 \text{ mm}^2$  versus  $4522 \pm 1276 \text{ mm}^2$  in the control group) or number of atherosclerotic lesions ( $1.4 \pm 0.3$  versus  $2.0 \pm 0.5$  in the control group).

**Conclusions.** The mouse is a good model for separating the differential effects of folate deficiency from those of hyperhomocysteinemia. Folate deficiency, in absence of hyperhomocysteinemia, does not increase either the size or number of atherosclerotic lesions.

**Key words:**

Folate deficiency. Atherosclerosis. B vitamins. Homocysteine.

## Introducción

Las especies animales carecen de la capacidad de sintetizar folato *de novo* y, por tanto, deben incorporar esta vitamina a través de la dieta<sup>1</sup>. Diferentes deficiencias en vitaminas del grupo B se han asociado a alteraciones cognitivas<sup>2</sup> o neuropsiquiátricas<sup>3</sup>, así como a defectos en el desarrollo del tubo neural en recién nacidos<sup>4</sup>. Parte de estas asociaciones pueden resultar de su importante papel en el metabolismo de la homocisteína<sup>5</sup>. Así, las principales causas de hiperhomocisteinemia en la población general se deben a alteraciones importantes de la función renal o a deficiencias nutricionales de folatos, piridoxina ( $B_6$ ) o cianocobalamina ( $B_{12}$ ).

El aumento de la homocisteína total en el plasma se asocia a múltiples enfermedades<sup>6</sup>, desde la enfermedad de Alzheimer hasta la aterotrombosis. Múltiples estudios epidemiológicos han confirmado que la hiperhomocisteinemia es un hecho prevalente en pacientes con accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, enfermedad vascular periférica y trombosis venosa<sup>7-9</sup>. La homocisteína total plasmática y las concentraciones de folato y vitamina  $B_6$  se correlacionan inversamente<sup>10</sup> y es más frecuente encontrar valores bajos de estas vitaminas en pacientes con aterotrombosis que en sujetos control<sup>11</sup>. En un estudio prospectivo realizado en mujeres se demostró que las que consumían una menor cantidad de folato presentaban un riesgo más elevado de padecer una enfermedad cardiovascular<sup>12</sup>. Además, un polimorfismo frecuente en el gen de la enzima 5,10 metilenotetrahidrofolato

reductasa ha sido descrito como un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular, particularmente cuando las concentraciones de folato plasmático están disminuidas<sup>13</sup>.

Algunos datos apuntan a la posibilidad de que el déficit de folato es, aunque sólo en parte, un factor de riesgo cardiovascular independiente de la homocisteína<sup>14,15</sup>. Por ejemplo, en individuos con hipercolesterolemia familiar pero normohomocisteinémicos se ha descrito que la administración local aguda de 5-metiltetrahidrofolato, la principal forma circulante de folato, revierte la disfunción endotelial sin alterar los valores de homocisteína<sup>16,17</sup>.

Estudios recientes en modelos experimentales *in vivo* han demostrado que un incremento moderado de la concentración plasmática de homocisteína acelera el desarrollo de arteriosclerosis en distintas localizaciones<sup>18,19</sup>. Sin embargo, hasta el momento no se dispone de trabajos experimentales en animales alimentados con una dieta similar a la típicamente occidental en los que se examine la posible interacción entre el déficit de folato y el riesgo de arteriosclerosis en ausencia de hiperhomocisteinemia.

## Material y métodos

### Animales, dieta y diseño

Veintidós ratones hembra C57BL/6 de 8 semanas de edad fueron subdivididos en 2 grupos experimentales en función de la dieta. Fueron mantenidos en condiciones óptimas de temperatura (20 °C) y humedad relativa (55%), con ciclos programados de luz-oscuridad de 12 horas y con libre acceso a agua y comida. Ambos grupos fueron alimentados durante 32 semanas con una dieta Western (una dieta rica en grasas que induce obesidad y diabetes tipo 2; TD 88137, Harlan Tekland) o una dieta Western deficiente en folatos (TD 01187, Harlan Tekland). La experimentación de los animales se llevó a cabo siguiendo las normas y recomendaciones para la utilización de animales de laboratorio<sup>20</sup>.

### Análisis plasmáticos

Al final del tratamiento, y después de un ayuno de 14 horas, se extrajeron muestras de sangre de la vena de la cola entre las 8 y 10 de la mañana en un tubo que contenía 2 µl de EDTA al 4,5% por cada 100 µl de sangre. De este espécimen se obtuvo plasma y la fracción eritrocitaria donde medir la homocisteína o el folato. Se analizaron las concentraciones plasmáticas de folatos y homocisteína al inicio y a las 16 y 32 semanas de tratamiento, así como la vitamina  $B_{12}$  y los folatos eritrocitarios al final del estudio, mediante la utilización de equipos comerciales adaptados a un autoanalizador Imx® (Abbott Diagnostics)<sup>21</sup>. Se determinaron las concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicéridos, glucosa, creatinina y urea, con la utilización de equipos comerciales (Roche Diagnostics) adaptados a un autoanalizador BM/HITACHI 911. También se analizaron la concentración de hematíes, el hematocrito, la concentración de hemoglobina y el volumen corpuscular medio (VCM) utilizando el analizador HmX (Beckman Coulter). La

prueba de tolerancia a la glucosa se realizó mediante el cálculo del área bajo la curva de las concentraciones de glucosa obtenidas en diferentes tiempos tras una inyección intraperitoneal de ésta (1 mg/g peso corporal)<sup>22</sup>.

#### *Análisis histológico y morfométrico de las lesiones arterioscleróticas*

A las 32 semanas de tratamiento los ratones fueron sacrificados. Se extrajeron los corazones, que fueron embebidos en OCT (Tissue-Tek) y se realizaron secciones de 10 µm en un criotomo (Shandon, a 28 °C). Se cuantificaron el número de lesiones y el área de lesión arteriosclerótica presente en 4 secciones de la región proximal de la aorta, teñida con Oil Red O y contrateñida con hematoxilina de Harris<sup>23</sup>.

#### *Análisis estadístico*

Se utilizó el análisis estadístico de la t de Student para comparar las diferencias entre los grupos experimentales. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $p < 0,05$ . Todos los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar.

### **Resultados**

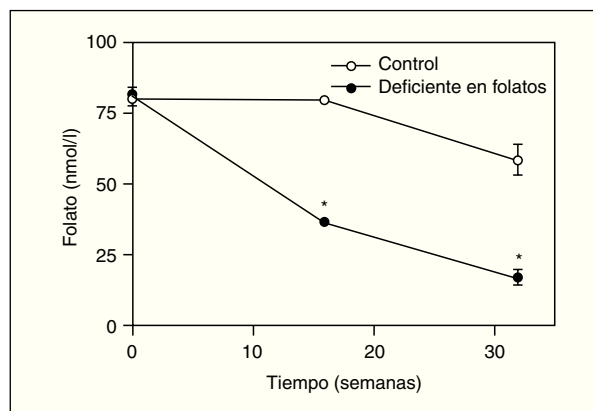
Los ratones C57BL/6 alimentados con la dieta Western deficiente en folatos presentaron una reducción significativa de la concentración plasmática de folatos respecto al grupo alimentado con una dieta Western control a 16 ( $37,4 \pm 0,7$  frente a  $80,2 \pm 1,4$  nmol/l;  $p < 0,01$ ) y 32 semanas de tratamiento ( $17,5 \pm 2,7$  frente a  $58,9 \pm 5,1$  nmol/l;  $p < 0,01$ ) (fig. 1). Esto sucedió, aunque en menor escala, con los valores de folato eritrocitario ( $703,6 \pm 31,8$  frente a  $1361,0 \pm 83,9$  nmol/l;  $p < 0,01$ ) analizados tras 32 semanas de dieta (tabla 1).

La concentración de hematíes y hemoglobina, el hematocrito y el VCM no difirieron significativamente entre los grupos ( $7,1 \pm 0,1$  frente a  $7,1 \pm 0,1$   $10^{12}$ /l;  $119 \pm 2$  frente a  $120 \pm 1$  g/l;  $33,7 \pm 0,5$  frente a  $33,7 \pm 0,5\%$ ;  $47,3 \pm 0,2$  frente a  $47,4 \pm 0,2$  fl en el grupo alimentado con dieta Western control).

Otros determinantes de la concentración de homocisteína, como la vitamina B<sub>12</sub> o la creatinina de ambos grupos, tampoco difirieron significativamente (tabla 1). En cuanto a la concentración de urea que, aunque menos específica, es más sensible que la creatinina para el diagnóstico de insuficiencia renal<sup>24</sup>, también fue similar en ambos grupos (tabla 1).

No se observó un incremento significativo de la concentración plasmática de homocisteína en los animales alimentados con la dieta Western deficiente en folatos respecto a los ratones alimentados con la dieta Western control ni a las 16 ( $13,3 \pm 1,1$  frente a  $9,6 \pm 1,5$  µmol/l, respectivamente) ni a las 32 semanas de estudio ( $8,6 \pm 1,0$  frente a  $6,8 \pm 0,7$  µmol/l, respectivamente) (fig. 2).

Los ratones ganaron peso con rapidez durante el curso de la dieta, pero no se observaron diferencias



**Figura 1.** Concentración plasmática de folato en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta Western control o con una dieta Western deficiente en folatos. \* $p < 0,05$ .

significativas en el incremento de peso de ambos grupos. Tampoco se encontraron diferencias en otros parámetros que podrían afectar al desarrollo de arteriosclerosis de estos animales. Es el caso de las concentraciones plasmáticas de lípidos, glucosa o, incluso, del test de sobrecarga de glucosa (tabla 2).

Los ratones de ambos grupos desarrollaron lesiones vasculares del tipo estría grasa, y ésta fue cuantificada. El grupo con dieta deficiente en folatos presentó un área de lesión de  $5.310 \pm 1.346$  mm<sup>2</sup>, mientras que en el grupo control era de  $4.522 \pm 1.276$  mm<sup>2</sup>; estas diferencias no son estadísticamente significativas (fig. 3). Tampoco se alcanzaron valores significativamente diferentes en cuanto al número de lesiones arterioscleróticas en la sección de la aorta proximal estudiada, expresada por animal, que fue de  $2,0 \pm 0,5$  lesiones para los ratones control y de  $1,4 \pm 0,3$  lesiones para los ratones alimentados con una dieta deficiente en folatos (fig. 4).

**Tabla 1. Principales determinantes biológicos de la concentración de homocisteína en ratones C57BL/6 alimentados con dieta Western control (n = 12) o Western deficiente en folatos (n = 10) durante 32 semanas**

	Control	Deficiente en folatos
Folato eritrocitario (nmol/l)	1361,0 $\pm$ 83,9	703,6 $\pm$ 31,8*
Vitamina B <sub>12</sub> (pmol/l)	42520,0 $\pm$ 4103,0	40720,0 $\pm$ 3490,0
Urea (mmol/l)	8,6 $\pm$ 0,1	8,6 $\pm$ 0,2
Creatinina (µmol/l)	39,5 $\pm$ 0,5	37,8 $\pm$ 2,1

\* $p < 0,01$ .

Resultados expresados como media  $\pm$  error estándar.

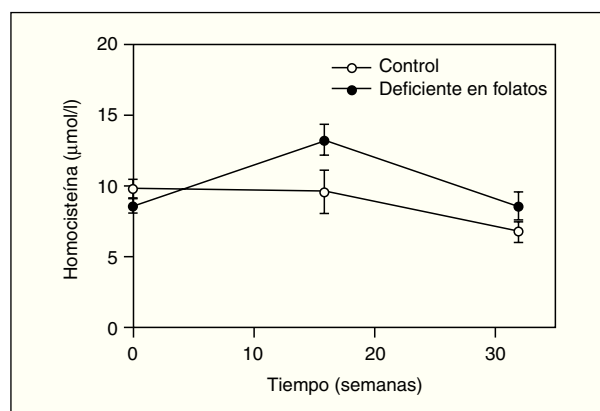


Figura 2. Concentración plasmática de homocisteína en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta Western control o con una dieta Western deficiente en folatos. No hay diferencias significativas en ninguno de los 3 puntos analizados.

## Discusión

La resistencia de los ratones a desarrollar signos de deficiencia de folato tras una dieta deficitaria en esta vitamina durante una parte importante de su vida, que no suele superar los 24-30 meses, es notable. Este hecho se aprecia, sobre todo, por la resistencia de los animales a presentar depleción de folato celular (p. ej., en los eritrocitos) y, por ello, a desarrollar el cuadro característico de la deficiencia de folato, que incluye hiperhomocisteinemia primero y anemia megaloblástica después. Esta resistencia contrasta de forma clara con los signos y síntomas que desarrollan los humanos con deficiencia de folato<sup>25</sup>.

Nuestro estudio demuestra que un déficit en la ingesta de folato, con independencia del estado hiperhomocisteinémico, no produce un efecto directo en el área ni el número de lesiones arterioscleróticas en el modelo animal estudiado. Este resultado es compatible con los de otros estudios de la bibliografía. Hofmann et al<sup>19</sup>, aunque utilizaron ratones

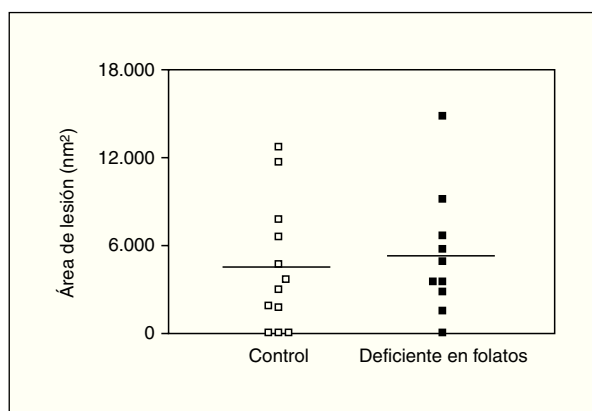


Figura 3. Área de lesión arteriosclerótica en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta Western control (n = 12) o con una dieta Western deficiente en folatos (n = 10). No hay diferencias significativas en los 2 grupos analizados.

*knockout* para la apolipoproteína E (apoE<sup>-/-</sup>) alimentados con una dieta de mantenimiento deficitaria en folato, B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>, no detectaron hiperhomocisteinemia ni tampoco diferencias significativas en las lesiones arterioscleróticas. En otro estudio realizado en ratones apoE<sup>-/-</sup> se observaron aumentos de homocisteína y arteriosclerosis sólo cuando a la dieta deficitaria en folatos se le añadió metionina (un aminoácido precursor de homocisteína) u homocisteína<sup>26</sup>.

El estudio que se presenta reproduce una situación que es frecuente en la población occidental que, en parte, consume dietas ricas en grasas (que causan obesidad y diabetes tipo 2) y pobres en folatos. Una posibilidad es que el efecto de la deficiencia de folato sobre el riesgo cardiovascular se manifieste, en primer lugar, como una mayor tendencia a la disfunción endotelial, que se agravaría sólo en caso de que coexistiera hiperhomocisteine-

**Tabla 2. Concentraciones plasmáticas de determinantes biológicos de arteriosclerosis en ratones C57BL/6 alimentados con la dieta Western control (n = 12) o la dieta Western deficiente en folatos (n = 10) durante 32 semanas**

	Control	Deficiente en folatos
Glucosa (mmol/l)	12,3 ± 0,6	12,3 ± 0,6
AUC	10,7 ± 2,0	11,1 ± 3,2
Colesterol (mmol/l)	5,9 ± 0,4	5,7 ± 0,3
Triglicéridos (mmol/l)	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,02

AUC: área bajo la curva de las concentraciones de glucosa tras el test de sobrecarga de glucosa.

Resultados expresados como media ± error estándar.

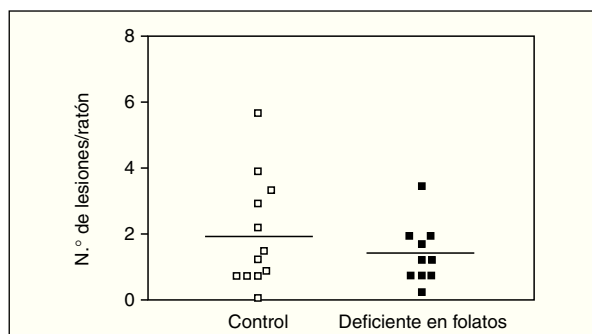


Figura 4. Número de lesiones arterioscleróticas en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta Western control (n = 12) o con una dieta Western deficiente en folatos (n = 10). No hay diferencias significativas en los 2 grupos analizados.

mia. Hay un gran número de estudios *in vivo* e *in vitro* en los que se proponen mecanismos que tratan de explicar los efectos adversos de la hiperhomocisteinemia y su relación con la enfermedad vascular. Éstos incluyen: disfunción endotelial debida a disminución de la disponibilidad de sustancias vasodilatadoras, como el óxido nítrico<sup>27,28</sup>, además del aumento de la agregación plaquetaria<sup>9,29</sup>, la coagulabilidad<sup>30-33</sup>, la proliferación de células musculares lisas vasculares<sup>34</sup> y la adhesión de monocitos y leucocitos al endotelio, todos ellos eventos clave en el desarrollo de la arteriosclerosis<sup>35-37</sup>. Hay datos experimentales en ratas hiperhomocisteinémicas por depleción de folato en los que se baraja la posibilidad de que sean los bajos valores de la vitamina los causantes de la disfunción endotelial observada<sup>38</sup>. Además, se ha demostrado que una deficiencia de folato compromete la producción de óxido nítrico endotelial, lo cual podría contribuir a esta disfunción<sup>38</sup>. Por tanto, es posible que estos efectos no se manifiesten por la deficiencia incompleta de folato que presentan estos ratones y que se asocia a una situación de normohomocisteinemia.

En conclusión, los datos del presente estudio demuestran que la deficiencia parcial de folato no aumenta la susceptibilidad a la arteriosclerosis en un ratón modelo de obesidad y diabetes tipo 2, al menos cuando no se presenta asociada a hiperhomocisteinemia.

## Bibliografía

- Shane B. Folate chemistry and metabolism. En: Folate in health and disease. Bailey LB, editor. New York: Marcel Dekker Inc., 1995; p. 1-22.
- Duthie JD, Whalley LJ, Collins AR, Leaper S, Berger K, Deary IJ. Homocysteine, B vitamin status, and cognitive function in elderly. *Am J Clin Nutr* 2002;75:908-13.
- Penninx BWJH, Guralnik JM, Ferrucci L, Fried LP, Allen RH, Stabler SP. Vitamin B<sub>12</sub> deficiency and depression in physically disabled older women: epidemiologic evidence from the Women's Health and Aging Study. *Am J Psychiatry* 2000;157:715-21.
- Czeizel AE. Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation. *BMJ* 1993;306:1645-9.
- Graham IM, O'Callaghan P. The role of folic acid in the prevention of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:577-87.
- Blanco-Vaca F. Hiperhomocisteinemia asociada a múltiples enfermedades, desde la aterotrombosis al Alzheimer: ¿casualidad o causalidad? *Clin Invest Arterioscl* 2003;15:69-72.
- Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999;131:363-75.
- Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughton E, Cahalane S, Fowler B, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991;324:1149-55.
- Burke AP, Fonseca V, Kolodgie F, Zieske A, Fink L, Virmani R. Increased serum homocysteine and sudden death resulting from coronary atherosclerosis with fibrous plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1936-41.
- Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *J Am Med Assoc* 1993;270:2693-8.
- Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattstrom L, Boers G, Ueland P, et al. Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation* 1998;97:437-43.
- Rimm EB, Willett WC, Hu FB, Sampson L, Colditz GA, Maaron JE, et al. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 1998;279:359-64.
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.
- Morrisson HI, Schaubel D, Desmeules M, Wigle DT. Serum folate risk of fatal coronary Heart disease. *JAMA* 1996 275:1893-6.
- Verhoef P, Hennekens CH, Malinow MR, Kok FJ, Willett WC, Stampfer MJ. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of ischaemia. *Stroke* 1994;25:1924-30.
- Verhaar MC, Rabelink DJ. Future for folates in cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest* 1999;29:657-8.
- Verhaar ML, Wever RMF, Kastelein JJP, Van Dam T, Koomans HA, Rabelink TJ. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, improves endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;97:237-41.
- Zhou J, Moller J, Danielsen CC, Bentzon J, Ravn HB, Austin RC, et al. Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1470-6.
- Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, et al. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest* 2001; 107:675-83.
- Committee on Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council, Washington, DC, 1985.
- Blanco-Vaca F, Arcelús R, González-Sastre F, Ordóñez-Llanos J, Queralto-Compañó JM. Comparison of the Abbott Imx® and a high-performance liquid chromatography method for measuring total plasma homocysteine. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:327-9.
- Julve JG, Escolà-Gil JC, Marzal-Casacuberta A, Ordóñez-Llanos J, González-Sastre F, Blanco-Vaca F. Increased production of very-low-density lipoproteins in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II and fed with a high-fat diet. *Biochim Biophys Acta* 2000;1488:233-44.
- Escolà-Gil JC, Julve JG, Marzal-Casacuberta A, Ordóñez-Llanos J, González-Sastre F, Blanco-Vaca F. ApoA-II expression in CETP transgenic mice increases VLDL production and impairs VLDL clearance. *J Lipid Res* 2001;42:241-8.
- Blanco Vaca F, Cortés Rius M, González Sastre F. Urea y creatinina plasmáticas como parámetros diagnósticos de insuficiencia glomerular. *Med Clin (Barc)* 1986;87:617-21.
- Herbert V. Biochemical and hematologic lesions in folic acid deficiency. *Am J Clin Nutr* 1967;20:562-72.
- Zhou J, Moller J, Ritskes-Hoitinga M, Larsen ML, Austin RC, Falk E. Effects of vitamin supplementation and hyperhomocysteinemia on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 2003; 168:255-62.
- Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, Leopold JA, Rudd MA, Trollet M, et al. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 2000;106:483-91.
- Weiss N, Heydrick S, Zhang YY, Bierl C, Cap A, Loscalzo J. Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine β-synthase-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:34-41.
- Durand P, Lussier-Cacan S, Blanche D. Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor activity in rats. *FASEB J* 1997;11:1157-68.
- Rodgers GM, Conn MT. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 1990;75:895-901.

31. Lentz SR, Sadler JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 1991;88:1906-14.
32. Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, et al. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest* 2001;107: 675-83.
33. Mayer O, Filipovsky J, Hromádka M, Svobodová V, Racek J, Mayer O Jr, et al. Treatment of hyperhomocysteinemia with folic acid: effects on homocysteine levels, coagulation status, and oxidative stress markers. *J Cardiol Pharmacology* 2002;39:851-7.
34. Tsai J, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh C, Haber E, Schlegel R, et al. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:6369-73.
35. Fu WY, Dudman NP, Perry MA, Wang XL. Leukocytes extravasation in acute homocysteinemic rats. *Atherosclerosis* 2002;161:177-83.
36. Koga T, Claycombe K, Meydani M. Homocysteine increases monocyte and T-cell adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 2002;161:365-74.
37. Wang G, Woo CW, Sung FL, Siow YL. Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1777-83.
38. Symons JD, Mullick AE, Ensuna JL, Ma AA, Rutledge JC. Hyperhomocysteinemia evoked by folate depletion. Effects on coronary and carotid arterial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:772-80.