

128 J.C. Melchor^{a,b}
A. Valladolid^a
M. Rueda^c
R. Pérez^c

^aDepartamento de Obstetricia y Ginecología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco. Hospital de Cruces. Barakaldo. Vizcaya. España. ^bObstetricia y Ginecología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco. Hospital de Cruces. Barakaldo. Vizcaya. España. ^cLaboratorio de Bioquímica. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco. Hospital de Cruces. Barakaldo. Vizcaya. España.

Este estudio ha sido realizado gracias a una beca concedida por Wyeth, empresa que no ha participado en el diseño del estudio, en la recogida de los datos, en el análisis de éstos ni en la preparación del manuscrito.

Correspondencia:

Dr. J.C. Melchor Marcos.
Jaureguialde, 7, 3.º izda.
48993 Getxo. Vizcaya. España.
Correo electrónico: jmelchorm@sego.es

Fecha de recepción: 17/12/04

Aceptado para su publicación: 10/1/05

Efecto del ácido fólico, el ácido levofolínico y el ácido fólico más vitamina B₁₂ en los valores de homocisteína plasmática total en mujeres sanas en edad reproductiva

Effect of folic acid, levofolinic acid and folic acid plus vitamin B₁₂ on plasma total homocysteine in healthy young women. A randomized, controlled trial

RESUMEN

Objetivo: Una concentración elevada de homocisteína plasmática total (tHcy) es un factor de riesgo para los defectos del tubo neural, aborto de repetición y desprendimiento de placenta. Estos valores elevados de tHcy pueden disminuirse administrando dosis farmacológicas de ácido fólico o ácido levofolínico. Este estudio se ha diseñado para comparar el efecto reductor de la homocisteína con la toma oral de ácido fólico, ácido levofolínico y ácido fólico más vitamina B₁₂ en mujeres sanas en edad reproductiva.

Sujetos y métodos: Estudio aleatorizado y controlado, con 60 mujeres sanas, no gestantes, con edad entre 18 y 40 años, que fueron seleccionadas de forma aleatoria para recibir oralmente durante 30 días uno de los siguientes tratamientos: 5 mg/día de ácido fólico (n = 20), 5 mg/día de ácido levofolínico (n = 20) o 400 g de ácido fólico + 2 g de vitamina B₁₂ (n = 20). Todas las pacientes siguieron con su dieta

habitual. Se realizaron determinaciones sanguíneas en los días 0 (antes del inicio del tratamiento) y +2, +5, +10, +30, +60 y +90. Los valores plasmáticos de tHcy se determinaron por inmunoanálisis de polarización fluorescente (coeficiente de variación: 3,1%). Los datos se expresan como valores totales (mol/l). Para el estudio estadístico se han empleado los tests de Kolmogorov, de la t de Student, ANOVA y de Bonferroni.

Resultados: No había diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos con respecto a las cifras basales de tHcy. Los valores plasmáticos descendieron durante los 30 días del tratamiento y persistían por debajo de los valores basales tanto en el día +60 como en el +90. Las diferencias en la evolución entre los 3 grupos fueron estadísticamente significativas. El ácido levofolínico fue el preparado que produjo un descenso más rápido e intenso de los valores de tHcy en comparación con los grupos que tomaron ácido fólico o ácido fólico + vitamina B₁₂.

Conclusiones: Estos resultados sugieren que la suplementación con 5 mg/día de ácido levofolínico induce un descenso más rápido e intenso de la homocisteína plasmática total que las mismas dosis de ácido fólico o que la asociación de ácido fólico + vitamina B₁₂. Esta diferencia es significativa ya desde el quinto día de tratamiento.

PALABRAS CLAVE

Homocisteína. Hiperhomocisteinemia. Ácido levofolínico. Ácido fólico. Ácido fólico más vitamina B₁₂.

ABSTRACT

Objective: A high plasma total homocysteine (tHcy) concentration is a risk factor for neural tube defects, recurrent spontaneous abortion, and abruptio placentae. Elevated plasma tHcy can be lowered by administration of pharmacological doses of folic and levofolonic acid. The present study was performed to compare the homocysteine-lowering potential of folic acid with and without vitamin B₁₂ and levofolonic acid supplementation in healthy young women.

Subjects and methods: In a randomized, controlled trial, 60 healthy non-pregnant women, aged 18-40 years old, were randomly assigned to receive one of the following three treatments for 30 days: supplementation with 5 mg/day of folic acid (oral) (n = 20) or 5 mg/day of levofolonic acid (oral) (n = 20) or 400 mg folic acid plus 2 µg vitamin B₁₂ (oral) (n = 20). All the women followed their normal diets. Venous blood samples were collected after the subjects had fasted overnight, beginning at the start of the 30-day intervention period (day 0) and on days 2, 5, 10, 30, 60 and 90 of intervention. Plasma tHcy levels were determined by fluorescence polarization immunoassay (coefficient of variation: 3.1%). Data are expressed as total value (mmol/l). The data were analyzed for statistical differences using the Kolmogorov, Student, Bonferroni and ANOVA tests.

Results: There were no significant differences among the three groups with respect to baseline

concentrations of plasma tHcy. Plasma tHcy levels decreased during the 30-day intervention and persisted below basal values on days 60 and 90. The differences in decreases among groups were statistically significant. Levofolonic acid had a faster and stronger effect in reducing tHcy levels than the same doses of folic acid and folic acid plus vitamin B₁₂.

Conclusions: These results suggest that supplementation with 5 mg/day levofolonic acid has a faster and stronger effect in reducing tHcy levels than the same doses of folic acid and folic acid plus vitamin B₁₂. This difference was significant from the fifth day of supplementation.

KEY WORDS

Homocysteine. Hyperhomocystinemia. Levofolonic acid. Folic acid. Folic acid with vitamin B₁₂.

INTRODUCCIÓN

Una concentración elevada de homocisteína plasmática total (tHcy) es un factor de riesgo para el desarrollo de malformaciones congénitas, especialmente defectos del tubo neural¹⁻³, así como para la aparición de determinadas complicaciones del embarazo como aborto de repetición, desprendimiento de placenta, crecimiento intrauterino retardado, trastornos hipertensivos del embarazo e incluso muerte fetal⁴⁻⁷.

Fuera del ámbito perinatal, la hiperhomocisteinemia está relacionada con problemas vasculares, especialmente aterosclerosis y trombosis, aunque se desconoce el mecanismo por el que la tHcy causa el daño vascular y promueve la trombosis^{8,9}. También está por dilucidar si la tHcy es un marcador biológico de un posible déficit de folatos o un factor causal de los citados problemas vasculares y perinatales. Lo cierto es que se ha podido comprobar que estos valores elevados de tHcy pueden disminuirse administrando dosis farmacológicas de ácido fólico o de ácido levofolínico^{10,11}.

En España existen 3 tipos de preparados comerciales con folatos que se emplean habitualmente durante el período preconcepcional y en las fases iniciales del embarazo. Un grupo de ellos lleva únicamente ácido fólico, otro asocia vitamina B₁₂ al áci-

130 do fólico y un tercer grupo realiza la suplementación con ácido levofolínico.

El efecto hipohomocisteinémico del ácido fólico es conocido desde hace tiempo. Sin embargo, el efecto reductor de la homocisteína por parte del ácido levofolínico es menos conocido. Recientemente, Fabre et al¹² han demostrado, por primera vez, que dosis terapéuticas de ácido levofolínico tienen un efecto hipohomocisteinémico más rápido e intenso que el del ácido fólico. En este ensayo no se incluía la asociación de ácido fólico con vitamina B₁₂.

Puesto que algunos estudios señalan que la vitamina B₁₂ parece aumentar el efecto hipohomocisteinémico del ácido fólico^{13,14}, hemos diseñado este estudio con la finalidad de comprobar el efecto reductor de la homocisteína tras la suplementación oral con ácido fólico solo, ácido levofolínico o ácido fólico más vitamina B₁₂ en mujeres sanas en edad reproductiva; es decir, para valorar el efecto que sobre la homocisteína tienen los 3 preparados de folatos existentes en nuestra farmacopea.

SUJETOS Y MÉTODOS

Se trata de un estudio aleatorizado y controlado, realizado en el Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital de Cruces (Vizcaya) entre abril y octubre de 2002. Un total de 60 mujeres de 18-40 años de edad fueron seleccionadas de forma aleatoria para recibir oralmente durante un período de 30 días uno de los siguientes tratamientos: 5 mg/día de ácido fólico en una sola toma (Acfol®; Laboratorios Italfármaco) (n = 20), 5 mg/día de ácido levofolínico en una sola toma (Isovorin®; Laboratorios Wyeth) (n = 20) o 400 µg de ácido fólico + 2 µg de vitamina B₁₂ en una sola toma (Folidoce®; Laboratorios Italfármaco) (n = 20). Todas las pacientes continuaron durante el tratamiento con su dieta habitual.

Se excluyó del ensayo a las mujeres que en el momento de la selección aleatoria estuvieran gestantes o presentaran antecedentes de enfermedad gastrointestinal, hepática, renal o cardiovascular. Tampoco se incluyó a las que estuvieran tomando suplementos vitamínicos, anticonvulsivos, antiepilépticos o quimioterápicos frente a la malaria. Una mujer quedó gestante durante la realización del estudio y fue excluida del ensayo. En su lugar se incluyó un nuevo caso.

La selección aleatoria se realizó de forma centralizada mediante asignación aleatoria generada por ordenador. Las pacientes recibieron la medicación que les correspondió, y al finalizar el período de tratamiento, se comprobó su correcto cumplimiento. Las participantes conocían la medicación que estaban ingiriendo y todas ellas fueron adecuadamente informadas del objetivo y desarrollo del estudio. El ensayo cumplía las normas emanadas de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética de nuestro Hospital. Todas las participantes firmaron un consentimiento informado. El estudio fue aceptado y aprobado también por la Agencia Española del Medicamento.

Se realizaron determinaciones sanguíneas de homocisteína en los días 0 (determinación basal antes del inicio del tratamiento), durante el tratamiento (en los días +2, +5, +10, +30) y posteriormente en los días +60 y +90. La extracción de sangre se realizó a primera hora de la mañana en tubos con EDTA. Las muestras se colocaban en hielo y en los primeros 20 min se centrifugaban a 3.000 g durante 10 min. Los tubos se etiquetaron mediante códigos de barras, de tal forma que el analista desconocía en todo momento el grupo terapéutico al que correspondía la muestra. Los valores plasmáticos de homocisteína se determinaron por inmunoanálisis de polarización fluorescente (coeficiente de variación: 3,1%). Los valores se expresan como valores totales en µmol/l.

El análisis de los datos fue realizado por un estadístico ajeno a nuestro grupo, que desconocía la medicación que correspondía a los datos que estaba analizando.

La respuesta al tratamiento se calculó para cada participante como el cambio porcentual entre la concentración plasmática de tHcy plasmática antes del tratamiento (día 0) y cada uno de los días de observación, tanto durante el tratamiento (días +2, +5, +10 y +30) como en los días +60 y +90 en los que las mujeres ya habían dejado el tratamiento. Las diferencias entre las observaciones realizadas antes del tratamiento y en cada uno de los períodos de observación tuvieron una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov). Dentro de cada grupo de tratamiento, la comparación entre el valor medio de cada día y el valor basal (día 0) se ha realizado mediante el test de la t de Student.

La comparación de las medias en los 3 grupos de tratamiento están basadas en el test de la F de la ta-

Tabla 1 Características basales de los 3 grupos de tratamiento

	Grupo ácido levofolínico	Grupo ácido fólico	Grupo ácido fólico + vitamina B ₁₂	p
Edad (años)	28,70 ± 5,38	27,50 ± 4,35	30,25 ± 6,24	0,28
Peso (kg)	57,80 ± 7,38	62,43 ± 9,40	58,15 ± 5,98	0,12
Talla (cm)	163,0 ± 4,87	164,2 ± 6,08	163,2 ± 6,41	0,80
Índice de masa corporal	21,80 ± 3,14	23,13 ± 3,12	21,88 ± 1,55	0,24
Folatos dieta (g/día)	302,4 ± 101,7	304,3 ± 89,4	302,0 ± 81,8	1,00
Homocisteína basal (mol/l)	8,52 ± 1,76	8,75 ± 2,19	9,13 ± 1,58	0,58

bla ANOVA corregido por el efecto intrasujeto (dado que tenemos medidas de los sujetos en varios tiempos y éstas deben ser comparadas dentro de cada sujeto). En aquellos casos en que el test de la F de la tabla ANOVA indicara rechazo de la hipótesis nula de igualdad de las medias, se empleó como método de resolución de contrastes múltiples el test de Bonferroni (dado que las comparaciones a efectuar eran bajas). De esta forma, se podía evaluar las medias 2 a 2 y conocer dónde estaban realmente las diferencias, corrigiendo la p y realizando un cálculo del nivel de significación para cada comparación. Se han considerado como significativos valores de $p < 0,05$.

El análisis se ha realizado con el programa estadístico SPSS versión 11.0 (SPSS, Inc. Chicago, EE.UU.).

RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan las características generales de los 3 grupos de tratamiento. Como se puede observar, los 3 son homogéneos y no presentan ninguna diferencia significativa entre ellos en cuanto a edad, peso, talla, índice de masa corporal ni con respecto a la ingesta habitual de folatos en la dieta. Igualmente, los valores basales de homocisteína plasmática antes del tratamiento eran similares en los 3 grupos (8,52 mol/l en el grupo de ácido levofolínico; 8,75 mol/l en el de ácido fólico y 9,13 mol/l en el de ácido fólico + vitamina B₁₂).

Los valores plasmáticos de homocisteína descendieron durante el período de tratamiento en los 3

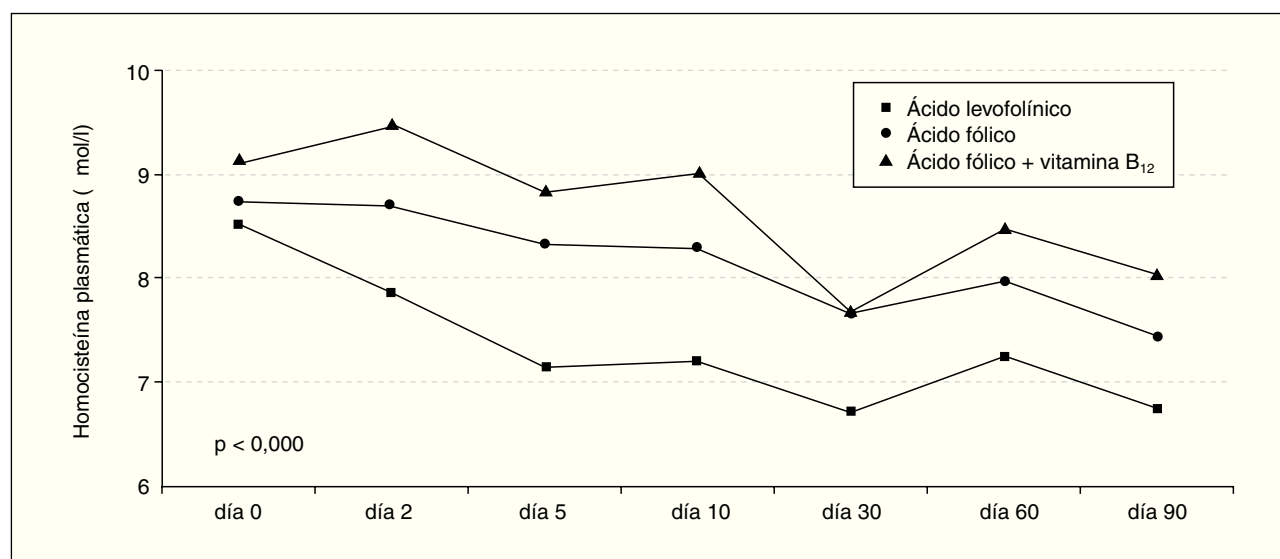


Figura 1. Evolución de los valores de homocisteína plasmática basal.

132 grupos. El nivel más bajo se observa en el día +30, persistiendo por debajo de los valores basales tanto en el día +60 como en el día +90 (fig. 1).

El estudio estadístico de estos datos mediante el análisis de la varianza permite confirmar que, analizados en conjunto, demuestran una clara significación estadística ($p = 0,000$) y que la evolución en el tiempo indica cambios que son igualmente significativos ($p = 0,000$).

Para poder comprobar dónde estaban estas diferencias, aplicamos el test de Bonferroni y observamos que había diferencias significativas tanto entre el grupo tratado con ácido levofolínico y el tratado con ácido fólico solo ($p = 0,000$), como entre el grupo tratado con ácido levofolínico y el tratado con ácido fólico más vitamina B₁₂ ($p = 0,000$). También existían diferencias entre el grupo tratado con ácido fólico solo y el tratado con ácido fólico más vitamina B₁₂ ($p = 0,039$).

Con el fin de interpretar mejor estas diferencias encontradas entre los 3 grupos, comparamos a continuación la reducción de los valores de homocisteína

plasmática basal dentro de cada grupo de tratamiento, comparando el valor de cada día en relación con el valor basal del día 0 (tabla 2).

Como se puede observar, el descenso de la homocisteína basal es más precoz e intenso con el ácido levofolínico que con las otras dos medicaciones.

El ácido levofolínico induce un descenso de la homocisteína evidente ya a los 2 días de tratamiento (-8%), y es del -16% al quinto día. Al finalizar los 30 días de tratamiento, la concentración de homocisteína plasmática es un 21% inferior a la previa al tratamiento, y se mantiene tras la suspensión de éste (días 60 y 90) en valores un 15-20% inferiores a los basales. Esta reducción de la homocisteína, en comparación con el día 0, es significativa ya desde el quinto día de suplementación farmacológica y la significación se mantiene hasta el día 90.

Con respecto al ácido fólico, aunque a los 2 días prácticamente presenta valores muy similares a los basales, con posterioridad el descenso de la concentración de homocisteína plasmática es de un 5% entre los días quinto y décimo de tratamiento y de

Tabla 2 Reducción de los valores de homocisteína plasmática basal. Estudio estadístico en relación con los valores basales

Día	Medicación	Media \pm DE	Descenso (%)	Casos	p*
0	Ácido levofolínico	8,52 \pm 1,76		20	
	Ácido fólico	8,75 \pm 2,19		20	
	Ácido fólico + vitamina B ₁₂	9,13 \pm 1,58		20	
2	Ácido levofolínico	7,86 \pm 1,65	7,74	20	0,23
	Ácido fólico	8,70 \pm 2,12	0,57	20	0,942
	Ácido fólico + vitamina B ₁₂	9,47 \pm 1,88	+ 3,72	20	0,54
5	Ácido levofolínico	7,15 \pm 1,21	16,07	20	0,007
	Ácido fólico	8,33 \pm 1,71	4,80	20	0,503
	Ácido fólico + vitamina B ₁₂	8,83 \pm 1,60	3,28	20	0,554
10	Ácido levofolínico	7,20 \pm 0,94	15,49	20	0,0052
	Ácido fólico	8,29 \pm 1,71	5,25	20	0,464
	Ácido fólico + vitamina B ₁₂	9,02 \pm 1,60	1,20	20	0,828
30	Ácido levofolínico	6,72 \pm 0,94	21,12	20	0,0002
	Ácido fólico	7,65 \pm 2,03	12,57	20	0,108
	Ácido fólico + vitamina B ₁₂	7,68 \pm 1,31	15,88	20	0,003
60	Ácido levofolínico	7,25 \pm 1,60	14,90	20	0,022
	Ácido fólico	7,97 \pm 1,84	8,91	19	0,237
	Ácido fólico + vitamina B ₁₂	8,47 \pm 1,32	7,22	20	0,160
90	Ácido levofolínico	6,75 \pm 1,19	20,77	15	0,002
	Ácido fólico	7,45 \pm 1,88	14,85	16	0,068
	Ácido fólico + vitamina B ₁₂	8,04 \pm 1,29	11,93	15	0,037

*Comparación con la misma medicación en el día 0 (t de Student).

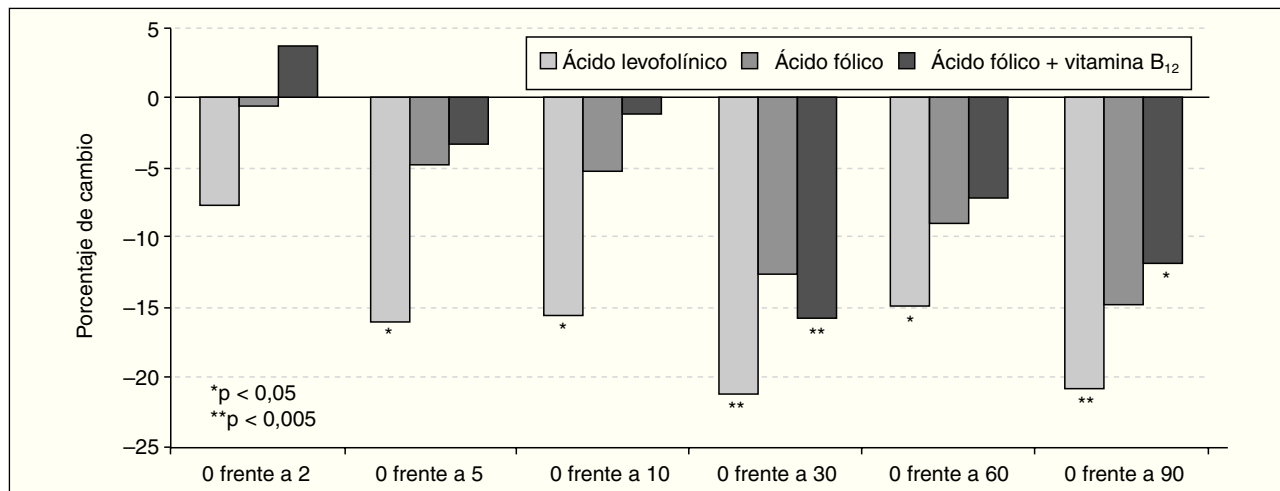


Figura 2. Reducción de los valores de homocisteína plasmática basal (porcentaje de cambio).

un 12% al finalizar los 30 días de tratamiento. El efecto sobre la homocisteína plasmática persiste tras finalizar el tratamiento, y es entre un 9 y un 15% inferior a los valores basales a los días 60 y 90, respectivamente. Sin embargo, la reducción de la homocisteína que induce el ácido fólico no es significativa en ninguno de los días analizados.

El descenso de la homocisteína plasmática con el ácido fólico más vitamina B₁₂ es más lento que con las otras 2 medicaciones, y es preciso finalizar los 30 días de tratamiento para que se objetive un descenso claro (16%). Durante este primer mes, las variaciones son mínimas (1-3%) e incluso se produce un pequeño aumento a los 2 días de iniciarse el tratamiento. Tras suspender el tratamiento, los valores de homocisteína plasmática se mantienen entre un 7 y un 12% inferiores a los valores basales (días 60 y 90).

En la figura 2 se reseña de forma gráfica, para cada medicación, la reducción de los valores de homocisteína plasmática basal con los datos presentados en la tabla 2.

No se produjo ningún episodio adverso durante la realización del ensayo en ninguna de las mujeres participantes.

DISCUSIÓN

Nuestro estudio confirma que el efecto hipohomocisteinémico del ácido levofolínico es más precoz

e intenso que el del ácido fólico, tanto si éste se usa solo o asociado a la vitamina B₁₂. La comparación entre el ácido levofolínico y el ácido fólico ya se había descrito previamente¹². El trabajo de Fabre et al es, hasta el momento, el primero y único estudio realizado que ha demostrado el beneficio, en términos de reducción de la homocisteína, del ácido levofolínico sobre el ácido fólico en pacientes jóvenes no gestantes¹². Por ello, no podemos realizar la comparación de nuestros resultados con otros estudios, ya que dichos ensayos se han realizado bien en pacientes de edad avanzada o bien en sujetos con diferentes enfermedades vasculares¹⁵⁻¹⁷ o se han realizado tan sólo con preparados de ácido fólico¹³.

Pero nuestro ensayo, con un diseño similar al de Fabre et al¹², se diferencia de éste en que añade al estudio un grupo que recibe suplementación con ácido fólico y vitamina B₁₂. La razón de incluir este preparado es analizar en un mismo ensayo los 3 preparados que habitualmente se emplean en nuestro país para la suplementación peri o posconcepcional con folatos; es decir, el ácido levofolínico y el ácido fólico solo o en combinación con la vitamina B₁₂.

Y lo que hemos visto es que aunque la combinación de ácido fólico y la vitamina B₁₂ reduce los valores de homocisteína, el descenso es significativamente menor que el inducido por el ácido levofolínico. Además, este efecto hipohomocisteinémico del ácido fólico más vitamina B₁₂ es apreciable tan sólo a partir de los 30 días de tratamiento, mientras

134 que la reducción de la homocisteína por parte del ácido levofolínico es evidente ya desde el quinto día de tratamiento.

Por el contrario, la reducción de la homocisteína inducida por el ácido fólico no presentaba diferencias significativas con los valores basales en ninguno de los días analizados. Estos datos parecen confirmar los estudios previos que indican que la vitamina B₁₂ incrementaría la acción hipohomocisteinémica del ácido fólico^{13,14}.

Es importante señalar que, con independencia del preparado empleado, el efecto reductor de la homocisteína plasmática se mantiene en el tiempo y así hemos podido comprobar que los valores de homocisteína persisten aun por debajo de los valores basales a los 60 y 90 días de iniciada la suplementación con folatos. Cualquiera que fuera el día estudiado, el porcentaje de reducción de la homocisteína plasmática es mayor cuando se emplea el ácido levofolínico que con los preparados de ácido fólico.

Este hallazgo permitiría sugerir la hipótesis de que en mujeres con tasas de homocisteína normales, que estén tomando folatos preconceptionales, el establecimiento de "períodos de descanso sin medicación" de un mes no reduciría su eficacia preventiva, dado que la homocisteína persiste por debajo de los valores iniciales incluso 60 días después de finalizar el tratamiento.

Al ser un estudio realizado en pacientes jóvenes y no gestantes, los resultados de este ensayo no son extrapolables a lo que pueda acontecer en el embarazo. Además, antes del inicio de la suplementación con folatos, los valores basales de homocisteína plasmática eran normales en todos nuestros casos. Asimismo, el objetivo de nuestro estudio no era encontrar el preparado más adecuado para reducir la incidencia de los defectos del tubo neural o determinadas complicaciones del embarazo, sino comparar el efecto reductor de la homocisteína de los 3 preparados de folatos más empleados en nuestro país durante el período preconcepcional y durante las primeras fases del embarazo.

Hay que pensar que las diferencias en el comportamiento de los diferentes preparados son debidas al propio fármaco y no achacables a sesgos de selección por cuanto los 3 grupos eran homogéneos y presentaban valores basales de homocisteína similares entre ellos.

En definitiva, nuestro estudio demuestra que la suplementación con 5 mg/día de ácido levofolínico induce un descenso más rápido e intenso de la homocisteína plasmática total que las mismas dosis de ácido fólico o de ácido fólico más vitamina B₁₂. Esta reducción es evidente ya desde el segundo día y significativa a partir del quinto día de tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM, et al. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube factors? *Metabolism*. 1994;43:1475-80.
2. Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet*. 1995;345:149-51.
3. Fabre E, Lou AC, Ruoti M. Papel de la homocisteína en el metabolismo celular y su relación con el embarazo. *Progr Diag Prenat*. 2003;15:32-9.
4. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia and recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae. *Lancet*. 1992;339:1122-3.
5. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:962-8.
6. López-Quesada E, Vilaseca MA, Lailla JM. Plasma total homocysteine in uncomplicated pregnancy and in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;108:45-9.
7. Goddijn-Wessel TA, Wouters MG, Van de Molen EF, Spuijbroek MD, Steegers-Theunissen RP, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1996;66:23-9.
8. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*. 1995;274:1049-57.
9. D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. *Blood*. 1997;90:1-11.
10. Fabre E, Gallo M, Lou AC, Juste G, Romero MS, Blasco C, et al. Efecto del ácido levofolínico sobre las concentraciones de homocisteína plasmática en la mujer joven y sana en la consulta preconcepcional. *Med Clin (Barc)*. 2001;117:211-5.

11. Venn BJ, Green TJ, Moser R, Mann JI. Comparison of the effect of low-dose supplementation with L-5-methyltetrahydrofolate or folic acid on plasma homocysteine: a randomized placebo-controlled study. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:658-62.
12. Fabre E, Lou AC, Juste G, Blasco C, González de Agüero R, Sobreviela M, et al. The effect of folic acid and levofolinic acid supplementation on plasma total homocysteine in healthy young women: preliminary results a single-blind, randomized, controlled trial. *Proceedings of 5th World Congress of Perinatal Medicine.* Barcelona: Walter de Gruyter GmbH&Co. Kg. Berlín; 2001.
13. Brönstrup A, Hages M, Prinz-Langenohl R, Pietrzik K. Effects of folic acid and combinations of folic acid and vitamin B-12 on plasma homocysteine concentrations in healthy, young women. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:1104-10.
14. Quinlivan EP, McPartlin J, McNulty H, Ward M, Strain JJ, Weir DG, et al. Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease. *Lancet.* 2002; 359:227-8.
15. Naurath HJ, Joosten E, Riezler R, Stabler SP, Allen RH, Lindenbaum J. Effects of vitamin B₁₂, folate, and vitamin B₆ supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. *Lancet.* 1995;346:85-9.
16. Landgren F, Israelsson B, Lindgren A, Hultberg B, Andersson A, Brattstrom L. Plasma homocysteine in acute myocardial infarction: homocysteine-lowering effect of folic acid. *J Intern Med.* 1995;237:381-8.
17. González Ordóñez AJ, Medina Rodríguez JM, Fernández Álvarez CR, Sánchez García J, Fernández Carreira JM, Álvarez Martínez MV, et al. Reducción de concentraciones elevadas de homocisteína con ácido fólico y vitaminas B en pacientes con tromboembolia venosa: relación entre la respuesta y genotipo C677T de la metilen tetrahidrofólico reductasa (MTHFR). *Med Clin (Barc).* 2000;114:7-12.