



ORIGINALES

Presión arterial, homocisteína y variantes polimórficas del gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3)

F. J. Rodríguez Esparragón, J. C. Rodríguez Pérez, A. Macías, Y. Hernández Trujillo, M. González Leiza y A. Caballero. Con la colaboración técnica de L. Estupiñán

Unidad de Investigación, Servicio de Nefrología, Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

RESUMEN

Fundamento y objetivo: El polimorfismo G894T en el gen humano NOS3 se ha sugerido como un determinante genético que contribuye a modular las variaciones de las concentraciones de homocisteína (tHcy) a través de un efecto indirecto sobre el catabolismo del folato. Nos planteamos estudiar la contribución de las variantes NOS3 G894T y 4a/b a las variaciones de presión arterial y la contribución de estas variaciones a la modulación de concentraciones de tHcy.

Pacientes y métodos: Analizamos 158 hombres sanos. Los genotipos de los polimorfismos NOS3 se determinaron mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior digestión enzimática (G894T) y por PCR (4a/b). Las concentraciones de tHcy mediante inmunofluorescencia polarizada.

Resultados: En nuestra población la variante G894T no parece contribuir de forma significativa a las variaciones de presión arterial, pero obtuvimos una gradación de concentraciones de tHcy en función de los genotipos G894T ($P = 0,01$). No obtuvimos un efecto modulador significativo sobre los niveles de tHcy para la variante 4a/b, si bien su contribución a la variación de cifras de presión arterial resultó estadísticamente significativa.

Conclusiones: Nuestros resultados muestran un efecto modulador de la variante 4a/b en el gen NOS3 sobre la variación de concentraciones de tHcy que se produce, parcialmente y a expensas de incrementos de valores de presión arterial. En análisis multivariante, el papel del polimorfismo G894T del gen NOS3 sobre la modulación de las concentraciones de tHcy, no resultó sin embargo estadísticamente relevante.

Palabras clave: **Gen óxido nítrico sintasa. Polimorfismo. Homocisteína. Presión arterial.**

ARTERIAL BLOOD PRESSURE VARIATIONS: HOMOCYSTEINE AND NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE POLYMORPHISMS (NOS3)

SUMMARY

Background: The nitric oxide synthase (NOS3) G894T gene polymorphism seems as a genetic determinant of total homocysteine (tHcy) concentrations through an effect on folate catabolism. We tested for a significant contribution to blood pressure values for the NOS3 G894T and 4a/b gene polymorphisms and whether those changes could explain the modulating effect on tHcy concentrations.

Correspondencia: Dr. José Carlos Rodríguez Pérez
Unidad de Investigación-Servicio de Nefrología
Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín
35010 Las Palmas de Gran Canaria
E-mail: jrodperd@gobiernodecanarias.org

¹ Este trabajo ha sido desarrollado dentro del Proyecto FIS 01/0190 y FUNCIS 6/02.

Patients and methods: We analyzed 158 healthy men. The NOS3 gene polymorphisms were determined by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment analysis (G894T) and by PCR (4a/b). Total homocysteine concentrations were evaluated by the fluorescence polarization immunoassay method.

Results: In our population we did not obtain a significant contribution of the G894T to blood pressure variations. However, tHcy mean concentration values differed according G894T genotypes ($P = 0.01$). Interestingly, we did not obtain a significant modulating effect on tHcy concentrations according to 4a/b genotypes although the 4a/b genotype distribution was statistically associated with blood pressure variations.

Conclusion: Our results showed a modulating effect of the NOS3 4a/b gene variant on tHcy concentrations that is at least partially provoked by discrete blood pressure increments. Nevertheless, our multivariate analysis did not show a statistical significant role for the NOS3 G894T gene polymorphism on tHcy concentrations.

Key words: **Nitric oxide synthase gene. Polymorphisms. Homocysteine. Blood pressure.**

INTRODUCCIÓN

El gen humano NOS3 (7q35-36) es responsable de la síntesis constitutiva de óxido nítrico (NO) y del mantenimiento del flujo sanguíneo¹. Las concentraciones elevadas de homocisteína y el tabaco comprometen, entre otros factores, la actividad enzimática NOS3^{2,3}. Numerosas evidencias sugieren que las alteraciones en la función endotelial asociadas a elevadas concentraciones de homocisteína (Hcy) se producen en parte por estrés oxidativo aumentando la generación de peróxidos, aniones hidroxilo y superóxido^{4,5}. Este incremento es a su vez responsable de la oxidación de cofactores de la actividad enzimática NOS3 y, consecuentemente, contribuye a disminuir la biodisponibilidad del NO^{4,5}. Por los datos existentes, en la población hipertensa coexisten incrementos de especies reactivas de oxígeno y cifras moderadamente elevadas de tHcy⁶⁻⁹, por el contrario en situaciones fisiológicas, la Hcy reacciona rápidamente con el NO para formar aductos S-nitroso-homocisteína constituyendo un mecanismo de protección vascular frente a la producción de peróxidos y especies reactivas de oxígeno^{10,11}. Todo ello justificaría un mecanismo indirecto mediante el cual el NO modularía los niveles de tHcy. El polimorfismo G894T (Glu298Asp) y la variante por repetición (VNTR) de 27bp en el intrón 4 (4a/b) parecen constituir las variantes de mayor relevancia en el gen NOS3. Además y en este sentido, Brown y cols.¹² muestran que la variante G894T en el gen NOS3 modula los niveles de Hcy en adultos sanos no fumadores y con bajos niveles de ácido fólico y presentan datos adicionales de que el mecanismo responsable se produce mediado por efectos sobre el catabolismo del folato. En algunos estudios previos se muestra su asociación positiva con enfermedad coronaria e hipertensión arterial en población caucásica así como, con diferencias en la producción de metabolitos del NO¹³⁻¹⁶. El polimorfismo 4a/b se ha asociado con diferencias no necesariamente lineales en la producción del mensajero, proteína NOS3 y actividad enzimática NOS3¹⁷.

En el presente trabajo se analiza el efecto modulador de las variantes G894T y 4a/b del gen NOS3 sobre los niveles plasmáticos de homocisteína total (tHcy) y su relación con incrementos en los valores de presión arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) y media (PAM).

PACIENTES Y MÉTODOS

Población estudiada

Se incluyó en este trabajo a 158 hombres sanos que cumplían los siguientes criterios de selección: ausencia de diabetes, tabaquismo y de antecedentes personales y familiares de enfermedad vascular, así como ausencia de tratamiento farmacológico. Los individuos reclutados pertenecen a una base de datos poblacional cuya descripción ya se ha realizado con anterioridad¹⁸. Seleccionamos datos antropométricos y medidas de presión arterial.

Métodos de laboratorio

Se obtuvieron muestras en ayunas y se centrifugaron de forma inmediata. La concentración de homocisteína plasmática total (tHcy) se determinó mediante inmunofluorescencia polarizada (FPIA). Las determinaciones de vitamina B₁₂ y ácido fólico mediante kits comerciales (Abbott Diagnostic División, IL).

Las determinaciones de los genotipos G894T en el exon 7 y 4a/b en el intrón 4 del gen NOS3 se realizaron mediante PCR-RFLP y PCR siguiendo protocolos descritos con anterioridad^{19,20}.

Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se presentan mediante índices de centralización y dispersión: media aritmética y desviación típica. Se contrastó la hipótesis de normalidad de dichas variables mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para una sola muestra. Las variables cualitativas se trataron analizando la frecuencia relativa de cada una de las categorías.

La prueba de Chi-cuadrado se utilizó para comprobar que las frecuencias de los genotipos de las variantes 4a/b y G894T del gen NOS3 no diferían, significativamente, de la esperada según el equilibrio Hardy-Weinberg.

La diferencia de medias para variables continuas en función de características dicotómicas se analizó con la prueba

Tabla I. Modelo de regresión lineal múltiple

Términos	Coefficientes (IC 95%)	p
α (constante)	2.637 (2.204, 3.070)	< 0,001
Edad	-0,001 (-0,006, 0,004)	0,630
Vitamina B ₁₂	-0,0003 (-0,0004, -0,0001)	0,001
Folato sérico	-0,052 (-0,073, -0,031)	< 0,001
Creatinina plasmática	0,507 (0,132, 0,883)	0,008
Portadores del alelo a x PAST†	0,137 (0,018, 0,257)	0,024

† El genotipo toma valor 1 para los individuos portadores del alelo a y 0 para los homocigóticos b/b. La PAS toma valor 1 para valores de PAS > 122 mmHg y 0 para valores de PAS ≤ 122 mmHg.

ba t-Student de igualdad de medias en muestras independientes o la alternativa no paramétrica U de Mann-Whitney cuando fuera necesario. La diferencia de medias de las variables continuas en función de los genotipos estudiados se testó mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) o la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis cuando no se cumplieran los supuestos iniciales del análisis de la varianza. Se testó la independencia entre las variables continuas mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Se construyeron modelos de regresión lineal múltiple para determinar si las asociaciones observadas entre tHcy y los diferentes genotipos de las variantes 4a/b y G894T del gen NOS3 eran independientes de otros factores que influían en los niveles de tHcy. El ácido fólico, la vitamina B₁₂ y la edad eran incluidas en el modelo, aunque no estuviesen significativamente relacionadas a tHcy en nuestra población, debido a su documentado impacto sobre los niveles de tHcy. Aquellas variables donde se obtuvo significación estadística en el análisis bivalente eran incluidas en el análisis multivariante. Se realizó una transformación logarítmica de la variable dependiente (tHcy) con el objetivo de que se cumplieran las hipótesis básicas del modelo de regresión lineal múltiple.

El análisis de los datos se efectuó con el paquete estadístico SPSS para Windows versión 11.0.

RESULTADOS

Características de la población estudiada

La edad media de los sujetos fue de 43,3 ± 12,5 años. Los niveles medios de homocisteína en plasma fueron 14,3 ± 5,5 μmolL⁻¹. Los sujetos participantes presentaban niveles normales de ácido fólico y vitamina B₁₂. Como se esperaba, existía una correlación significativa entre los niveles de tHcy, la edad (r_s = 0,197, p < 0,014, n = 157), vitamina B₁₂ (r_s = -0,354, p < 0,001, n = 130), niveles de folato sérico (r_s = -0,417, p < 0,001, n = 131) y creatinina plasmática (r_s = 0,330, p < 0,001, n = 157). Las dos variantes génicas pudieron determinarse en 149 sujetos y su distribución fue GG: 44,3%, GT: 46,3% y TT: 9,4%, así como a/a: 4,7%, a/b: 25,3% y b/b: 70%. La distribución genotípica no fue significativamente diferente de la frecuencia esperada en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Determinantes de las variaciones de homocisteína

En análisis bivalente, se obtuvo una relación gradual de los valores de PAS y PAD acorde a los genotipos 4a/b. Se halló una relación estadísticamente significativa de las variantes génicas 4a/b dicotomizadas como b/b y portadores del alelo a con las variaciones de la PAS (p = 0,022).

Una relación gradual de los valores de tHcy de acuerdo al genotipo G894T se obtuvo incluso antes de llegar a estratificar los valores de folato sérico. Por el contrario, no se obtuvieron diferencias significativas en lo referente al genotipo G894T con la PAS y PAD, y tampoco del genotipo 4a/b con los niveles de homocisteína incluso tras la estratificación por cuartiles de los niveles de folato sérico.

Toda la población estudiada fue posteriormente dicotomizada estableciendo como punto de corte el valor de la mediana de PAS (≤ 122 mmHg o > 122 mm Hg). Sorprendentemente, observamos una diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de tHcy de acuerdo a la variante génica de 4a/b en aquellos sujetos con PAS > 122 mmHg (p = 0,048). Por el contrario, no se observaron diferencias en los homocigotos GG frente a los portadores del alelo T estratificando por los valores de PAS (p = 0,09 y p = 0,07 respectivamente) para la variante G894T.

Para determinar qué variables intervenían en las variaciones de los niveles de tHcy y si nuestros hallazgos permanecían significativos tras la corrección por los factores conocidos que pudieran modificar las concentraciones de tHcy, construimos modelos de regresión lineal múltiple. Nuestros análisis indican que en nuestra población no fumadora los factores predictores de las concentraciones de tHcy fueron, los niveles de folato sérico, vitamina B₁₂, el término «portador del alelo a y PAS» y la creatinina plasmática. El término portador del alelo a y PAS, significa que aquellos sujetos portadores del alelo a de la variante génica 4a/b del gen NOS3 que poseen cifras de PAS > 122 mmHg presentaban concentraciones de tHcy un 14,7% más elevadas que el resto de las combinaciones. Este modelo explicaba el 29,2% de las variaciones en las concentraciones de tHcy (tabla I).

De acuerdo con el principio jerárquico, construimos un modelo de regresión lineal donde las variables portadores del alelo a y PAS permanecieran en el modelo a pesar de que ambas variables consideradas individualmente no fue-

Tabla II. Modelo de regresión lineal múltiple

Términos	Coefficientes (IC 95%)	p
α (constante)	2.634 (2.197, 3.072)	< 0,001
Edad	-0,001 (-0,006, 0,004)	0,676
Vitamina B ₁₂	-0,0003 (-0,0004, -0,0001)	0,001
Folato sérico	-0,053 (-0,076, -0,031)	< 0,001
Creatinina plasmática	0,521 (0,157, 0,894)	0,007
PAS	-0,046 (-0,162, 0,070)	0,430
Portadores del alelo a	-0,006 (-0,144, 0,133)	0,936
Portadores del alelo a x PAST†	0,178 (0,027, 0,383)	0,088**

† El genotipo toma valor 1 para los individuos portadores del alelo a y 0 para los homocigóticos b/b. La PAS toma valor 1 para valores de PAS > 122 mmHg y 0 para valores de PAS ≤ 122 mmHg.

** p < 0,10.

ran significativamente diferentes de cero ($\beta = 0$). Como se ha mencionado previamente los valores de PAS fueron dicotomizados debido a las diferencias observadas en las concentraciones de tHcy acorde a los genotipos 4a/b. Estas diferencias se mostraron estadísticamente significativas sólo en los sujetos varones con PAS > 122 mmHg. En estas condiciones el modelo explicaba el 31% de las variaciones de tHcy en nuestra población (tabla II). El término «portadores del alelo a y PAS > 122 mmHg» explicaba un incremento de las concentraciones de tHcy de 19,5% respecto al resto de las combinaciones.

DISCUSIÓN

En este trabajo mostramos que la variante 4a/b del gen NOS3 ligado a los valores PAS se muestra como un determinante de las variaciones en la concentración de tHcy plasmática. Brown y cols.¹² han mostrado un papel modulador y significativo de la variante G894T en las variaciones de la tHcy en dos poblaciones sanas, no fumadores y con bajos niveles de folato sérico. Estos mismos autores aportan evidencias de los mecanismos moleculares responsables de tal efecto. Sin embargo, mientras el papel funcional de la variante G894T en la actividad enzimática NOS3 permanece sin dilucidar²¹⁻²³, existen datos *in vivo* e *in vitro* de un papel funcional de la variante del intrón 4 en el gen NOS3^{14, 15, 17, 24}.

Los niveles plasmáticos de tHcy se han asociado en estudios transversales con la presión arterial en investigaciones comunitarias, especialmente con la PAS²⁵. En este sentido se especula que los niveles elevados de tHcy disminuyen la vasodilatación producida por el óxido nítrico²⁶ y como se ha publicado, incrementa el estrés oxidativo²⁷, estimula la proliferación de células musculares lisas²⁸ y altera las propiedades elásticas de la pared vascular²⁹. Existe igualmente un aumento de datos clínicos y experimentales que establecen una relación entre homocisteína y óxido nítrico^{3, 30}. Los estudios *in vitro* han aportado un cambio hacia un fenotipo contráctil en las células musculares lisas tratadas con homocisteína³¹. En nuestro trabajo, en análisis bivariable, encontramos un efecto modulador de G894T en las concentraciones de homocisteína, a la vez que no obtuvimos diferencias significativas en los valores de PA de acuerdo a los genotipos. En este primer análisis y contrariamente a los genotipos G894T, los genotipos 4a/b se asociaron de forma gradual con los valores medios de PA pero no con las concentraciones medias de tHcy. Sin embargo, tras estratificar por valores de PAS, encontramos una contribución significativa de los genotipos 4a/b a las cifras medias de tHcy. Este primer análisis sugería que ambas variables, genotipos 4a/b y cifras de presión arterial sistólica, deberían considerarse conjuntamente como determinantes de variación de las concentraciones plasmáticas de tHcy. Así, mientras que en el análisis multivariable no se obtuvo un papel significativo del polimorfismo G894T solo o en interacción con los cuartiles de folato o los valores de PA (no mostrado) si se obtuvo para la interacción 4a/b y PAS. Además, recientemente se ha publicado un estudio que muestra que las propiedades funcionales del 4a/b parecen ser dependientes de haplotipo, específicamente con la variante en el promotor T-786C²⁴.

A pesar de ello, nuestros resultados deben ser interpretados con prudencia debido a que no se incluyeron determinantes conocidos sobre las variaciones de tHcy, entre otros, el polimorfismo del C677T del gen MTHFR.

En conclusión, observamos que la variante génica 4a/b del gen NOS3 constituye un determinante de las variaciones en la concentración de tHcy en interacción con los valores de PAS, este efecto modulador del 4a/b depende de valores umbrales críticos de PAS. Esto último apoya el hallazgo de que la variante 4a/b actúa como un elemento cis-regulador conjuntamente con la variante T-786C en el promotor del gen NOS3.

BIBLIOGRAFÍA

- Schmidt HH, Walter U: NO at work. *Cell* 78: 919-25, 1994.
- Woo KS, Chook P, Lolin YI, Cheung AS, Chan LT, Sun YY, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS: Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 96: 2542-4, 1997.
- Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW, Brownlee M, Bones C, Newcombe RG, Lewis MJ: Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. *Circulation* 98: 1848-52, 1998.
- Weiss N, Heydrick SJ, Postea O, Keller C, Keaney JF, Jr., Loscalzo J: Influence of hyperhomocysteinemia on the cellular redox state-impact on homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med* 41: 1455-61, 2003.
- Stanger O, Weger M: Interactions of homocysteine, nitric oxide, folate and radicals in the progressively damaged endothelium. *Clin Chem Lab Med* 41: 1444-54, 2003.
- Kashyap MK, Yadav V, Sherawat BS, Jain S, Kumari S, Khullar M, Sharma PC, Nath R: Different antioxidants status, total antioxidant power and free radicals in essential hypertension. *Mol Cell Biochem* 277: 89-99, 2005.
- Rodrigo R, Passalacqua W, Araya J, Orellana M, Rivera G: Homocysteine and essential hypertension. *J Clin Pharmacol* 43: 1299-306, 2003.
- Rodrigo R, Passalacqua W, Araya J, Orellana M, Rivera G: Implications of oxidative stress and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 42: 453-61, 2003.
- Perry IJ: Homocysteine, hypertension and stroke. *J Hum Hypertens* 13: 289-93, 1999.
- Upchurch GR, Jr., Welch GN, Fabian AJ, Pigazzi A, Keaney JF, Jr., Loscalzo J: Stimulation of endothelial nitric oxide production by homocyst(e)ine. *Atherosclerosis* 132: 177-85, 1997.
- Liu L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, McMahon TJ, Dickfeld T, Marshall HE, Que LG, Stamler JS: Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell* 116: 617-28, 2004.
- Brown KS, Kluijtmans LA, Young IS, Woodside J, Yarnell JW, McMaster D, Murray L, Evans AE, Boreham CA, McNulty H, Strain JJ, Mitchell LE, Whitehead AS: Genetic evidence that nitric oxide modulates homocysteine: the NOS3 894TT genotype is a risk factor for hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1014-20, 2003.
- Wattanapitayakul SK, Mihm MJ, Young AP, Bauer JA: Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 22: 361-8, 2001.
- Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Wang J, Blangero J, Almasy L, Badenhop RB, Wilcken DE: Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 3147-53, 1997.

15. Wang XL, Wang J: Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 70: 241-51, 2000.
16. Pulkkinen A, Viitanen L, Kareinen A, Lehto S, Vauhkonen I, Laakso M: Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. *J Mol Med* 78: 372-9, 2000.
17. Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B, Wang J: Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett* 471: 45-50, 2000.
18. Rodríguez-Pérez JC, Rodríguez-Esparragón F, Hernández-Pérrera O, Anabitarte A, Losada A, Medina A, Hernández E, Fiuza D, Ávalos O, Yunis C, Ferrario CM: Association of angiotensinogen M235T and A(-6)G gene polymorphisms with coronary heart disease with independence of essential hypertension: the PROCAGENE study. *Prospective Cardiac Gene. J Am Coll Cardiol* 37: 1536-42, 2001.
19. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE: A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 2: 41-5, 1996.
20. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, Harada E, Masuda T, Koyama W, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Nakao K: Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 31: 1506-10, 1998.
21. McDonald DM, Alp NJ, Channon KM: Functional comparison of the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp polymorphic variants in human endothelial cells. *Pharmacogenetics* 14: 831-9, 2004.
22. Fricker R, Hesse C, Weiss J, Tayrouz Y, Hoffmann MM, Unnebrink K, Mansmann U, Haefeli WE: Endothelial venodilator response in carriers of genetic polymorphisms involved in NO synthesis and degradation. *Br J Clin Pharmacol* 58: 169-77, 2004.
23. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Antoniadis C, Skoumas J, Brown M, Stefanadis C: Evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and inflammatory markers: the ATTICA study. *Am Heart J* 148: 733-8, 2004.
24. Wang J, Dudley D, Wang XL: Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: e1-e4, 2002.
25. Van Guldener C, Nanayakkara PW, Stehouwer CD: Homocysteine and blood pressure. *Curr Hypertens Rep* 5: 26-31, 2003.
26. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J: Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 91: 308-18, 1993.
27. Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, Leopold JA, Rudd MA, Trolliet M, Heydrick S, Stark R, Klings ES, Moldovan NI, Yaghoubi M, Goldschmidt-Clermont PJ, Farber HW, Cohen R, Loscalzo J: Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 106: 483-91, 2000.
28. Lubec B, Labudova O, Hoeger H, Muehl A, Fang-Kircher S, Marx M, Mosgoeller W, Gialamas J: Homocysteine increases cyclin-dependent kinase in aortic rat tissue. *Circulation* 94: 2620-5, 1996.
29. Moat SJ, McDowell IF: Homocysteine and endothelial function in human studies. *Semin Vasc Med* 5: 172-82, 2005.
30. Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS: Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation* 99: 1156-60, 1999.
31. Mujumdar VS, Tummalapalli CM, Aru GM, Tyagi SC: Mechanism of constrictive vascular remodeling by homocysteine: role of PPAR. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C1009-C1015, 2002.