





Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas

Anexo I

D. JUAN RAMÓN HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

CERTIFICA,

Que el Consejo Ordinario de Departamento de Doctores en su sesión de fecha 21 de julio de 2015, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "Relevancia de polimorfismos génicos y la S-homocisteína en la epigénesis en arteria mamaria interna y aorta", presentada por el doctorando Don Jaime Alberto Serna Gómez y dirigida por los doctores Don Francisco Javier Rodríguez Esparragón y Don José Carlos Rodríguez Pérez.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 21 de julio de dos mil quince.







Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas

Programa de Doctorado: Patología Quirúrgica, Reproducción Humana y Factores Psicológicos y el Proceso de Enfermar

Título de la Tesis

Relevancia de polimorfismos génicos y la S-homocisteína en la epigénesis en arteria mamaria interna y aorta

Memoria presentada por **D. Jaime Alberto Serna Gómez** para optar al grado de

Doctor en Medicina y Cirugía por la ULPGC

Las Palmas de Gran Canaria, a 5 de octubre de 2015

Trabajo realizado bajo la dirección de los doctores Francisco Javier Rodríguez Esparragón y José Carlos Rodríguez Pérez, en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín.

Firmado,

Director

Director

Doctorando



Gobierno de Canarias

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE GRAN CANARIA DOCTOR NEGRIN

D. Francisco Javier Rodríguez Esparragón, Investigador Científico y Responsable

de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor

Negrín,

Certifica:

Que el trabajo de investigación titulado: "Relevancia de polimorfismos génicos y la

S-homocisteína en la epigénesis en arteria mamaria interna y aorta", ha sido

realizado por D. Jaime Alberto Serna Gómez, en la Unidad de Investigación del

Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, bajo mi dirección y

asesoramiento técnico y que una vez revisada la presente memoria la encuentro apta

para su defensa como tesis doctoral.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiendo el presente certificado en

Las Palmas de Gran Canaria, a 5 de octubre de 2015.

Firmado,

Francisco Javier Rodríguez Esparragón PhD.



Gobierno de Canarias

D. José Carlos Rodríguez Pérez, Jefe del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín y Profesor Titular de Medicina de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

Certifica:

Que el trabajo de investigación titulado: "Relevancia de polimorfismos génicos y la S-homocisteína en la epigénesis en arteria mamaria interna y aorta", ha sido realizado por D. Jaime Alberto Serna Gómez", en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, bajo mi dirección y asesoramiento técnico, y que una vez revisada la presente memoria la encuentro apta para su defensa como tesis doctoral.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiendo el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria, a 5 de octubre de 2015.

Firmado,

José Carlos Rodríguez Pérez MD, PhD.

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias de la Salud

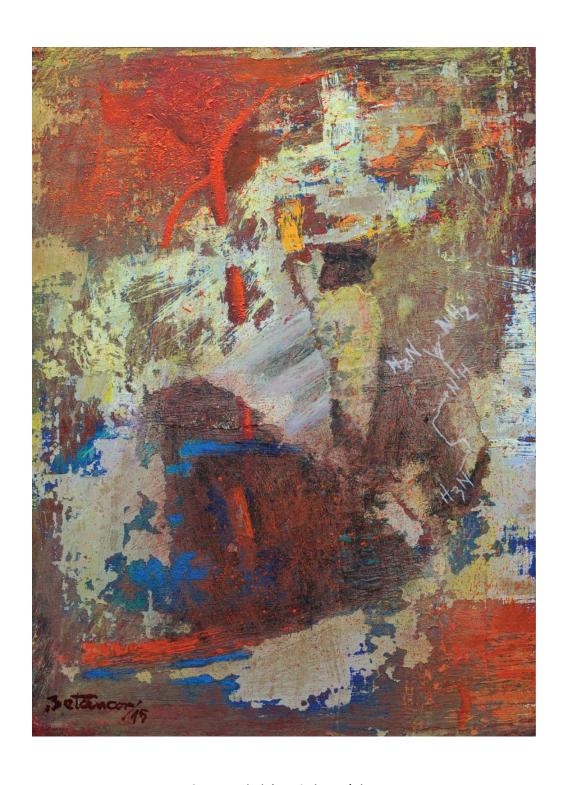
Relevancia

de polimorfísmos génicos y la S - homocisteína en la epigénesis en arteria mamaria interna y aorta

Jaime Alberto Serna Gómez MD.

Las Palmas de Gran Canaria | 2015



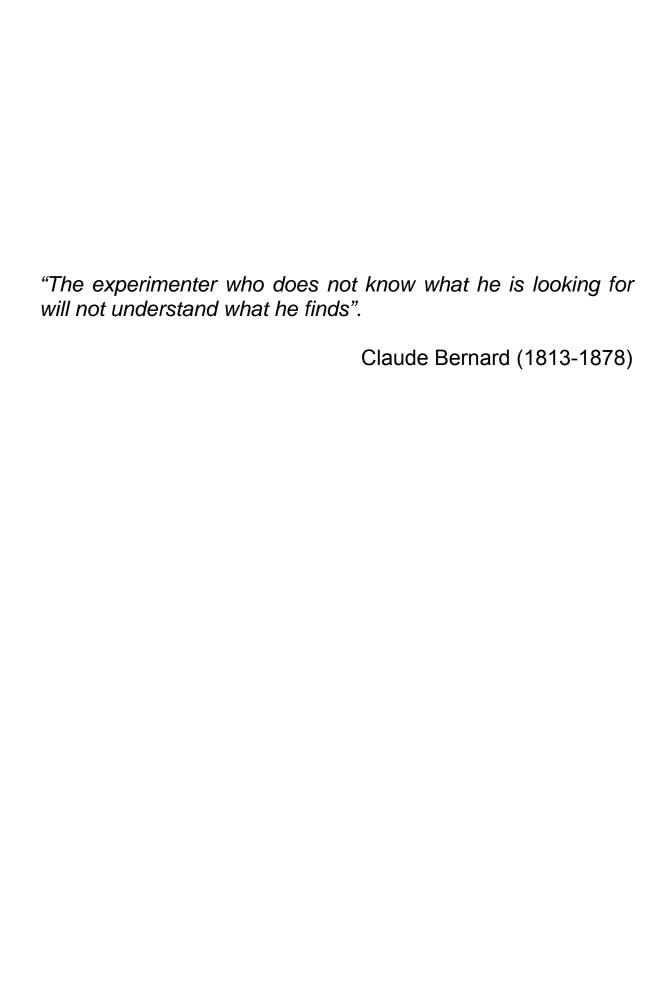


Composición Epigenética
Obra conjunta maestro/discípulo
Juan Betancor González /Jaime Alberto Serna Gómez /2015
Pintura Abstracta
Acrílico S/DM 37 x 27 cm

IN MEMORIAM Alberto Serna Gutiérrez MD. Diana María Serna Gómez Angélica Gómez Gómez

A quienes me debo

A quienes amo, cuyo amor correspondiente y tolerante, ha
permitido mi realización personal y profesional
A mis padres Alberto y Nelly
A mis hermanos Carlos Mario, Jorge Diego, John Jairo,
Elvira, Diana María y Juan Guillermo
A Mariola González López
A quienes con su esfuerzo diario propugnan por la
ascensión y convergencia del Universo



AGRADECIMIENTOS

"Gratus animus est una virtus non solum maxima, sed etiam mater virtutum omnium reliquarum". "Gratitude is not only the greatest of the virtues, but the parent of all of the others".

Marcus Tullius Cicero (106-43 a.C)

"Si he conseguido ver más lejos (que otros) es porque iba a hombros de gigantes", escribió el genio de la física, Isaac Newton, en carta remitida el 5 de febrero de 1675 al científico Robert Hooke. Agradecía así a sus antecesores en el tema, los aportes que le permitieron descubrir la ley de la gravitación universal.

En esa expresión parodiaba Newton la acreditada metáfora empleada durante el renacimiento para señalar la vuelta al saber de los antiguos, cuyo primer registro histórico data del siglo XII, siendo atribuida al erudito bajomedieval y filósofo neoplatónico Bernardo de Chartres (citado por su discípulo Juan de Salisbury en su obra Metalogicón-1159): "Somos como enanos a los hombros de gigantes. Podemos ver más, y más lejos que ellos, no por alguna distinción física nuestra, sino porque somos elevados por su gran altura".

Esta metáfora, agradecida y humilde, expresada por seres avanzados en su pensamiento y que han permitido saltos cuánticos en el progreso de la humanidad, me inspira al abrir una página de gratitud en un texto como el presente, en el cual plasmo los logros del trabajo de una década en la que he cabalgado sobre los hombros de hombres y mujeres grandes en alma y conocimiento. Ellos me han servido de soporte en múltiples ámbitos que tocan con el corazón y la razón, la teoría y la práctica, la reflexión y el análisis, el acompañamiento cálido, la palabra sincera y el aliento oportuno.

Decirles gracias a todas estas personas e instituciones que me han acompañado en éste arduo y dilatado recorrido, no es en este caso el cumplimiento de una norma o un protocolo. Es un acto de honestidad, de gratitud y afecto sincero para ellos y ellas.

Únicamente conseguimos avanzar merced al conocimiento acumulado. Es que la investigación "per se", es una actividad predominantemente colectiva, por ende, no es menester pretender divulgar que la culminación del actual bosquejo ha sido atributo de "motu proprio". La elaboración de esta tesis doctoral no es exclusivamente producto del esfuerzo genuino del doctorando, sino más bien de la voluntad cooperativa y coordinada de un colectivo.

El doctorando al abordar un nuevo argumento de estudio, ha de convertirse en historiador, ya que este ha de confrontar sus conocimientos científicos, actualizar los relacionados con la materia, asesorarse con expertos para lograr una visión integral del argumento a considerar, exponer objetivamente los hechos acaecidos, así como la trascendencia de los mismos; porque lo de antaño no es hoy un simple tipo de paramnesia de reconocimiento de "déjà vu", sino más bien, como afirmaba el célebre médico, historiador, ensayista y filósofo español, D. Pedro Laín Entralgo 1908-2001: "El rostro de la Historia de la Medicina es doble, jánico. Por una de sus caras mira con los ojos del médico hacia el porvenir; la otra se halla vuelta hacia el pasado, y con los ojos del historiador trata de poner luz en lo que fue".

Desde que inicié mi vida universitaria he observado que algunos maestros se muestran orgullosos de sus alumnos; yo soy un discípulo que está orgulloso de sus maestros. Por lo anterior, quiero dejar constancia de lealtad y gratitud a todos aquellos profesores (presentes, ausentes y anónimos) de quienes he recibido enseñanza y ejemplo, elementos estos que han sido de suma trascendencia para alcanzar mi formación profesional. A todos ellos mi ofrecimiento como homenaje y compromiso discipular.

Estoy en deuda con todas aquellas personas que con sus críticas y estímulos me ayudaron a culminar esta tarea, a todas ellas mis más sinceros agradecimientos. A los compañeros (as) de la Unidad de Investigación Biomédica del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín que me aportaron su experiencia y desinteresada asistencia en algún momento. De todos he aprendido algo. Gracias para siempre por los agradables e inolvidables instantes compartidos en el "Café de la Ciencia".

A todas ellas, en especial a quienes han trabajado a mi lado hombro a hombro en la última década en la Unidad de Investigación, en particular a los doctores Francisco Rodríguez Esparragón (Fran) y José Carlos Rodríguez Pérez (Directores de tesis), por su dedicación, paciencia y sapiencia; por su talante y talento, además de su extraordinario y acreditado desempeño científico. Por la lectura crítica del manuscrito, sus sucesivas revisiones y sugerencias, a más de la preparación de la exposición oral en la tutela del mismo.

A Fran primordialmente, porque esta ha sido su idea y en definitiva, el culmen de su esfuerzo. Por creer en mí y sobre todo por convertirse en cómplice de esta quimera. Por ser un estímulo constante para proseguir en el desarrollo, perfeccionamiento y defensa de tan colosal proyecto. Su entusiasmo, vocación y consagración a la labor investigadora, aunados a sus profundos conocimientos, han hecho tangible la culminación de esta tesis doctoral. Garbos por su certidumbre, por su atinada orientación académica y por encima de todo humana.

La asistencia de Araceli Caballero en la conformación de la base de datos, así como en el diseño de los formularios para la compilación de la información a través de Microsoft Office Acces, fue fundamental. A la Dra. María Dolores Fiuza Pérez por su constante estímulo. El manejo y análisis de las diferentes muestras obedece a la ingente voluntad de Érika Hernández Velázquez y Lidia Estupiñán Quintana. La diligencia y prestancia de Tatiana Roncancio Medina ha sido definitiva. El decidido y permanente interés de Miguel Ángel García Bello ha sido imprescindible, inestimable y crucial en el análisis estadístico.

Al equipo en pleno del Servicio de Cirugía Cardiovascular ("Heart team") del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. A los doctores Juan José Feijoo Osorio, Cipriano Carlos Abad Vázquez, Gerardo Ponce Rodríguez y José Ángel López Ruiz, por el aporte de las muestras de los tejidos biológicos objeto del estudio. Una alusión singular merecen los doctores Juan J. Feijoo O. y José Á. López R., su apremio y apoyo incondicional han sido cruciales. Al Dr. Pablo Enrique Melado Sánchez, involucrado permanentemente en la valoración y cuidado integral de nuestros enfermos. A Soraya Castellano Almeida, siempre leal al Servicio de Cirugía Cardiovascular. A las enfermeras (os), auxiliares de enfermería, instrumentistas, perfusionistas, celadores (as), administrativos (as) y los diferentes servicios implicados en la atención y asistencia de los pacientes (Admisiones, Hospitalización, Bloque del Área Quirúrgica, Anestesiología y Reanimación, Cuidado Intensivo, Cardiología, Medicina Interna, Hematología, Rehabilitación, Radiología,

Laboratorio Clínico, Cirugía Torácica, Neumología, Cirugía Vascular y Angiología, Cirugía Plástica y Reconstructiva).

A los doctores Bernardo Ochoa Arismendi (Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia), Juan Bernardo Ochoa Gautier (University of Pittsburgh Medical Center, Nestlé Health Care Nutrition, Pittsburgh-USA), Pedro Rafael Moreno Lara (Mount Sinai Hospital, New York-USA) y Alina Gautier Restrepo de Arismendi (Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia), sus cuantiosos aportes al saber, así como el rigor científico y el ahínco por los mismos han sido decisivos en el empeño y fundamento de esta obra. Su abono a mi semilla nata del cientifismo ha sido vital.

A mis padres Alberto y Nelly; a mis hermanos Carlos Mario, Jorge Diego, John Jairo, Elvira, Diana María y Juan Guillermo; a Mariola González López, a todos ellos (as), por su infinito cariño, por brindarme su confianza, por su ejemplar amistad, por su apoyo y comprensión. Por ser un legado de compromiso, esfuerzo y superación personal, a más de un referente en mi vida. Por el arrojo y soporte constante impartido en la ejecución de este trabajo, sin el cual ello no hubiese sido posible. Por vuestro amor absoluto.

Mi eterno sentimiento de gratitud, admiración y aprecio a mi Maestro gran canario Juan Betancor González, por su sincera amistad e invaluable ayuda en la elaboración de la pintura y el diseño artístico de la portada. A Juan Ramírez Verona y Ramón Saavedra Marrero por su orientación en la exposición audiovisual de esta tesis.

A Fusión Publicidad (Medellín, Colombia) y en especial a su gerente John Jairo Serna Gómez por su inquebrantable e incondicional asistencia en el diseño gráfico y logístico de esta obra y la portada, así como en su incesante empeño en que este proyecto arrimase a buen puerto. A Gráficas Letra (Madrid, España) y a su directora ejecutiva Ángela Cabrerizo De Diego por su contribución en el diseño del impreso. A Raquel Guerra Talavera por su atinado soporte en la maquetación e impresión del manuscrito. A Silva Gráficas (Las Palmas de Gran Canaria, España) por su acertado cometido en la concreción de la imprenta. A Sonia Gómez Gómez, su contribución en la ejecución de este apartado ha sido definitiva, categórica, diría que mágica.

Este trabajo ha sido financiado en parte merced a los aportes concedidos por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) PI061080 del Instituto de Salud Carlos III, de la Caja Rural de Canarias y la Fundación Mapfre-Guanarteme. La subvención de las mencionadas instituciones ha hecho posible llevar a buen término el presente trabajo.

Gracias a la dirección de nuestro hospital por el apoyo que procura a las iniciativas científicas y su carácter constructivo y cooperativo del que hace gala.

Al personal del Servicio de Investigación y Tercer Ciclo de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), a la Subdirección de Tercer Ciclo y Postgrado, así como al Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas (Facultad de Ciencias de La Salud) de la ULPGC, en particular a María Dolores Reyes Estupiñán (Tercer Ciclo y Postgrado), a los doctores D. Esteban Pérez Alonso y D. Juan Ramón Hernández Hernández, a Corina Lorenzo Marrero y Francisca Arocha Viera (Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas), siempre prestos (as) a orientar a los doctorandos con amabilidad, profesionalismo y decoro.

Al Instituto Social de la Marina de España y al Buque Hospital "Esperanza del Mar", a su esencia misma, por su confabulación en el último lustro en la ejecución de este proyecto durante las travesías en aguas del Atlántico (Costa Occidental de África).

A mis amigos(as) y compañeros(as) de trabajo y del devenir, que de un modo u otro, han respaldado este esfuerzo.

Esta tesis doctoral al abordar tópicos de medicina; "la más humana de las ciencias y la más científica de las humanidades" (en feliz expresión de Edmund D. Pellegrino 1920-2013), pretende ser asimismo un cálido y espontáneo reconocimiento a los enfermos de los que he asimilado gran parte de los conocimientos que he querido transmitir.

Finalmente, como diría D. José Alberto Mainetti, discípulo lainiano; "de epígrafe y también de colofón" en el presente escrito, alegoría de Chartres a la reivindicación del saber de nuestros predecesores: "Nos esse quasi nanos, gigantium humeris insidentes, ut possimus plura eis et remotiora videre, non utique proprii visus acumine, aut eminentia corporis, sed quia in altum subvehimur et extollimur magnitudine gigantea", para enaltecer su grandeza.

Esperando que esta obra sea precisamente eso; un paso más sobre hombros de gigantes.

Jaime A. Serna G.



TABLA DE CONTENIDO

	MEN RACT DDUC(CIÓN	9 13 17				
MARCO CONCEPTUAL							
	Escenario actual de la aterosclerosis						
• • •	1.1						
		Las enfermedades cardiovasculares en los EE. UU. de América					
		Las enfermedades cardiovasculares en Europa					
		1.4 Las enfermedades cardiovasculares en España y Canarias					
2.	Enfoque actual de la aterosclerosis						
	2.1 La aterosclerosis como prototipo de enfermedad inflamatoria						
	۷.۱	2.1.1 Placa aterosclerótica vulnerable e inflamación					
	2.2						
	2.2	2.2.1 Estrés oxidativo y enfermedad cardiovascular					
		2.2.2 Superóxidos y función endotelial					
		2.2.3 Estrés oxidativo y homocisteína					
3	Riolog	Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas					
Э.	3.1	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·					
	3.2	Disfunción endotelial y aterosclerosis					
	3.3	Citocinas y moléculas de adhesión					
	3.4	Monocitos (macrófagos) y aterosclerosis					
	3.5	· · · · · · · · · · · · · · · ·					
	0.0	NF- kB					
	3.6	Células espumosas, captación de las LDLm y el proceso					
		aterogénico					
	3.7	Las células musculares lisas y la matriz extracelular de los vasos					
		sanguíneos	53				
4.		Biología molecular de las HDL					
	4.1	Transporte inverso del colesterol					
	4.2	Funciones de las HDL independientes del transporte inverso del					
		colesterol					
_	-	4.3 Enzimas antioxidantes vinculadas a las HDL					
5.		nítrico y aterosclerosis	59				
	5.1	El óxido nítrico como mensajero intercelular					
	5.2	Óxido nítrico y función endotelial					
	5.3	Sintasas del óxido nítrico					
	5.4	Gen eNOS, óxido nítrico y enfermedades cardiovasculares					
		5.4.1 Ratones transgénicos <i>knockout</i> eNOS -/- Factores de riesgo cardiovascular					
6.		Factores de riesgo cardiovascular					
7.	Prevención y estimación del riesgo cardiovascular						
8.	Factores de riesgo epigenéticos						
9.	Homocisteína como factor de riesgo en la aterogénesis						
	9.1 Bioquímica de la homocisteína y de las reacciones de						
		transmetilación celular					
	0.0	9.1.1 S-adenosil-homocisteína					
	9.2	·					
		9.2.1 Determinantes genéticos					

			9.2.1.1 Polimorfismo C677T MTHFR					
		9.2.2	Factores Demográficos					
			9.2.2.1 Género					
			9.2.2.2 Envejecimiento					
		9.2.3	Factores nutricionales					
		9.2.4	Factores ambientales					
		9.2.5	Enfermedades asociadas a hiperhomocisteinemia					
		9.2.6	Medicamentos asociados a hiperhomocisteinemia					
		9.2.7	Otros factores relacionados con hiperhomocisteinemia					
	9.3	·						
	9.4		cisteína y estrés oxidativo					
		9.4.1	Especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno					
		9.4.2	Homocisteína y señalización redox					
	9.5	Homod	cisteína, eNOS, ADMA, DDAH y función endotelial					
	9.6	Homo	cisteína y trombosis					
	9.7		cisteína, folatos y función vascular					
	9.8	Homo	cisteína, folatos y evolución clínica					
10.	Enfer	medad ^v	vascular mediada por la homocisteína tiolactona	106				
	10.1	Homod	cisteinilización de las proteínas					
	10.2	Metab	olismo de la homocisteína a través de la homocisteína					
		tiolacto	ona					
	10.3	N-hom	nocisteinilización de las proteínas					
11.	Parac	oxonasa	s y aterosclerosis	115				
	11.1	Paraox	xonasa 1					
		11.1.1	Gen PON1					
		11.1.2	Polimorfismos de la región codificante del gen PON1					
		11.1.3	Polimorfismos de la región del promotor del gen PON1					
		11.1.4	Polimorfismos de la región codificante del gen PON1 y					
			enfermedad coronaria					
		11.1.5	Actividad de la enzima PON1					
		11.1.6	Determinantes de la expresión del gen PON1					
	11.2	Paraox	xonasa 2					
		11.2.1	Gen PON2					
		11.2.2	Polimorfismos del gen PON2					
			Actividad de la enzima PON2					
		11.2.4	Polimorfismos del gen PON2 y enfermedad coronaria					
	11.3		xonasa 3					
		11.3.1	Gen PON3					
		11.3.2	Actividad de la enzima PON3					
	11.4	Paraoxonasas, género y enfermedad coronaria						
		Paraoxonasas y su actividad durante el proceso de envejecimiento						
12.		netilarginina asimétrica como factor de riesgo cardiovascular 130						
	12.1	,						
		Gen D						
		•	s de expresión y actividad de las DDAH					
			sión y actividad de las DDAH en los vasos sanguíneos					
			sión del gen DDAH					
			, NOS y DDAH					
13.		nética		139				
	13 1	Método	os de cribado <i>(screening</i>) enigenéticos					

	13.2 Epigenética y medio ambiente					
	13.3 El Paradigma DOHaD					
	13.4 Mecanismos epigenéticos					
	13.5 Metilación del DNA					
	13.5.1 Metiltranferasas del DNA					
	13.5.2 Desmetilación del DNA					
	13.6 Modificación de histonas					
	13.6.1 Cromatina, histonas y organización del núcleo celular					
	13.6.2 Modificación postrasduccional de histonas13.6.3 Metiltransferasas de histonas					
	13.6.4 Desmetilación de historias					
	13.7 RNAs no codificantes					
	13.8 Epigenética y enfermedades complejas					
	13.8.1 Alteraciones de la impronta genómica y enfermedades					
	complejas					
14.	·	167				
17.	14.1 S-adenosil-homocisteína, metilación y aterogénesis	101				
	14.2 Metilación, células musculares lisas de los vasos sanguíneos y					
	aterosclerosis					
	14.2.1 Hipometilación del DNA					
	14.2.2 Hipermetilación del DNA					
	14.3 S-adenosil-homocisteína, metilación, homocisteína y aterosclerosis					
	14.4 Epigénesis, gen eNOS y homocisteína					
	14.5 Epigénesis, eNOS, homocisteína y gen DDAH2					
15.	Arteria mamaria interna y aterosclerosis	176				
	15.1 Conceptos anatómicos y fisiopatológicos					
16.	Cirugía de revascularización coronaria	179				
	16.1 Breve reseña histórica					
	16.2 Conceptos generales					
	16.3 Técnica quirúrgica					
	16.4 Indicaciones generales					
	FICACIÓN Y OBJETIVOS	189				
	DOLOGÍA	195				
	Tipo de estudio	195				
2.	Técnica operatoria y toma de muestras	195				
	2.1 Técnica operatoria					
•	2.2 Técnica quirúrgica					
3.	Tamaño muestral	200				
4.	Extracción del DNA	202				
5.	Determinación de la variante C677T [rs1801133, g.14783C>T,	000				
0	pAla222Val] del gen MTHFR	203				
6.	Determinación de los genotipos Gln192Arg [rs662, g21439A>G,	205				
7	pGln192Arg] y Met55Leu [rs85 del gen PON1]	205				
7.	Determinación del polimorfismo Ser311Cys del gen PON2	205				
8. 0	Determinación del grado de metilación en el promotor del gen DDAH2	206 208				
9. 10.						
10. 11.	Transcripción Inversa de RNA Expresión de los genes eNOs, iNOs y DDAH2 en los homogeneizados	210				
11.	vasculares	210				
12.	Protocolo HPLC	211				
13						

14. Análisis estadístico	215			
RESULTADOS	221			
 Características principales de la población estudiada 	221			
2. Homocisteína plasmática total, homocisteína (S/N) unida a				
proteínas y su relación con los diferentes genotipos	222			
3. Diferencias en la expresión génica entre los diferentes territorios arteriales				
4. Concentración de homocisteína total, S-homocisteína y grado de				
metilación del promotor del gen DDAH2	236			
5. Grado de metilación del promotor del gen DDAH2 y expresión de				
los genes eNOS y DDAH2	238			
DISCUSIÓN	243			
PERSPECTIVA "TRASLACIONAL"	251			
Medicina e investigación "traslacional"	251			
2. Investigación fundamental (básica) e investigación clínica	252			
3. Investigación cardiovascular "traslacional"	253			
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	261			
CONCLUSIONES	265			
CONCLUSIONS	269			
APORTACIONES ORIGINALES				
FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN				
ABREVIATURAS y ACRÓNIMOS	277 281			
FIGURAS				
TABLAS				
PUBLICACIONES				
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS				



RESUMEN

Solo conocemos parcialmente los mecanismos que explican la resistencia de la arteria mamaria interna (AMI) a la aterosclerosis (ATS). La homocisteína (Hcy) se encuentra en el plasma de diferentes formas: 1. Hcy reducida u oxidada. 2. Hcy-tiolactona (Hcy-T). 3. Hcy unida a proteínas (Hcy-p), como resultado de la S/N-homocisteinilización. En el presente trabajo, evaluamos la concentración de las proteínas S/N-homocisteiniladas en fragmentos de AMI obtenidos de pacientes en los que se efectuó cirugía de revascularización coronaria (CRC). Adicionalmente, investigamos si la concentración de estas proteínas se relacionó con algunas variantes genéticas comunes (polimorfismos). Analizamos si la concentración de Hcy plasmática total (tHcy), el nivel de S-homocisteína (S-Hcy) unida a proteínas (S-Hcy-p), los genotipos evaluados, o el grado de metilación promovido por la Hcy, se correlacionó con la expresión de los genes que codifican la sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS), la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) y la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2 (DDAH2) en los territorios vasculares evaluados (AMI versus aorta). Hallamos escasa proporción de S-Hcy-p en los fragmentos de AMI estudiados. Observamos relación entre la S-Hcy-p y los polimorfismos C677T de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) [rs1801133] y Metionina 55 Leucina (Met55Leu) de la enzima paraoxonasa 1 (PON1) [rs854560]. Apreciamos diferencia graduada en la concentración de S-Hcy-p y el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 en los punches aórticos, pero no en los fragmentos de AMI. No encontramos correlación entre el grado de metilación y la expresión del gen DDAH2 en los tejidos analizados (AMI versus aorta). Los polimorfismos evaluados parecen contribuir in vivo a las propiedades de unión de la Hcy a la AMI. La contribución a la expresión del gen eNOS y la metilación del promotor del gen DDAH2 inducido por la Hcy, parece ser tejidoespecífica e independiente de la vía DDAH2/ADMA/eNOS.

Palabras Claves. Homocisteína. Homocisteinilización. Polimorfismo. Expresión génica. Metilación.



ABSTRACT

The striking resistance of internal mammary artery (IMA) toward atherosclerosis is modulated by hitherto unknown mechanisms. In plasma, homocysteine (Hcy) occurs in reduced, oxidized, homocysteine thiolactone and a component of proteins as a result of N/S-homocysteinylation. We evaluated N/S-homocysteinylated protein levels in IMA fragments of patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG) and whether they were affected by genetic common variants (polymorphisms). We tested whether total Hcy (tHcy), Hcy-S incorporated proteins (Hcy-S-p) levels, genotypes or Hcy-induced methylation modifications, were related to differences in endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible endothelial nitric oxide synthase (iNOS) and dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 (DDAH2) gene expression between territories (IMA versus aorta). A small percentage of Hcy-S-proteins were found in IMA fragments. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T [rs1801133] and paraoxonase 1 (PON1) Leu55Met (rs854560) polymorphisms were associated with Hcy-S-proteins. We observed a gradual difference according to Hcy-S-proteins levels in the methylation degree of the DDAH2 gene promoter in aortic, but not in IMA fragments. No correlation between the degree of methylation and the DDAH2 gene expression levels was found in both types of analyzed fragments. Analyzed polymorphisms seem to contribute to the in vivo Hcy binding properties to IMA. The contribution of the Hcy-derived methylation modifications to DDAH2 and eNOS gene expression seems to be tissue-specific and independent of the DDAH2/ADMA/eNOS pathway.

Keywords. Homocysteine. Homocysteinylation. Gene polymorphisms. Gene expression. Methylation.



INTRODUCCIÓN

Hace más de un siglo William Osler (1849-1919) escribió; *The Principles and Practice of Medicine*¹. Este tratado, además de constituirse en un texto decisivo, determinó la transición entre el tratamiento sintomático y el abordaje racional de las enfermedades fundamentado en la fisiopatología. Un siglo después, con los avances en la genética humana, Barton Childs (1916-2010), escribió un segundo capítulo; *Genetic Medicine: A logic of disease*². Los dos mensajes primordiales transmitidos por Childs en su texto fueron: 1. En el siglo XXI, la medicina debe encaminarse hacia el tratamiento de los individuos, no de las enfermedades. 2. La salud debe entenderse como una función de los genes y del entorno³.

La enfermedad coronaria (EC) continúa siendo la primera causa de muerte en todo el mundo^{4,5}. La susceptibilidad de los vasos sanguíneos a la aterosclerosis (ATS) varía entre los diferentes territorios del organismo⁶. La resistencia innata de la arteria mamaria interna (AMI) a la ATS contrasta con la reconocida susceptibilidad de la aorta y las arterias coronarias a la aterogénesis⁷. Desconocemos los mecanismos biológicos que subyacen a dicha labilidad vascular. Este hecho revierte crucial relevancia en la comprensión de los factores implicados en la protección de los vasos sanguíneos frente a la ATS. Las diferencias en las propiedades antiaterogénicas de estas arterias proporcionan una estrategia ideal para la caracterización de estos factores.

La cirugía de revascularización coronaria (CRC) es la intervención quirúrgica realizada con mayor frecuencia en el mundo para mitigar la angina de pecho, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad por enfermedad coronaria (EC)⁸. La CRC (mediante injertos arteriales) representa a su vez el procedimiento quirúrgico de elección en el tratamiento de la enfermedad isquémica del corazón. La AMI es el injerto más utilizado en la CRC, con una excelente tasa de permeabilidad a largo plazo⁹⁻¹¹. Se han descrito diversos factores involucrados en la longevidad de los injertos vasculares, entre los que se cuenta el uso de la AMI en la CRC⁷. A *posteriori* del implante de la AMI en posición coronaria la hiperplasia de la intima y la ATS no constituyen inconvenientes habituales¹².

Este hecho sugiere que persiste algún nivel de protección de la AMI a la aterogénesis aún después de realizado el injerto.

El incremento de la Hcy plasmática es un factor de riesgo (FR) gradual e independiente en la génesis de las enfermedades cardiovasculares de origen aterosclerótico¹³ (ECV). La enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) convierte el 5,10-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) en la principal forma circulante de los folatos (siendo este a su vez donante de grupos metil) durante la remetilación de la Hcy. El polimorfismo C677T MTHFR incrementa los niveles de Hcy en los individuos con genotipo TT, como ha sido confirmado en estudios de asociación del genoma completo (GWAS)¹⁴.

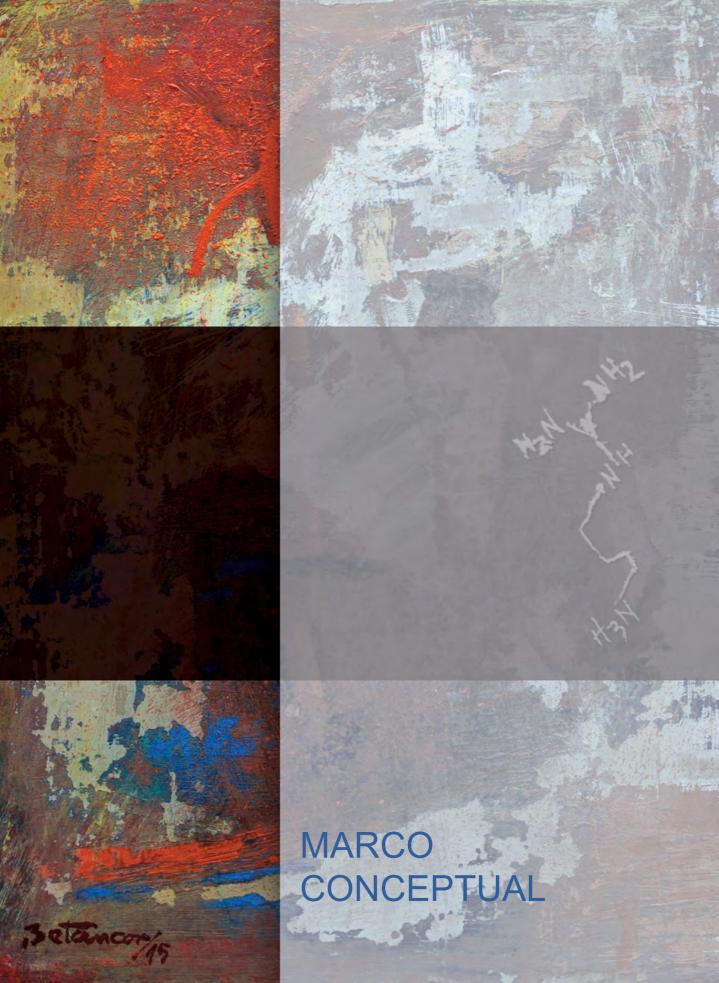
La Hcy causa disfunción endotelial ya que incrementa el estrés oxidativo y disminuye la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO^{*}). El incremento de Hcy además ejerce otros efectos deletéreos^{13,15}. La S-adenosil-metionina (SAM) constituye una importante fuente de grupos metil, siendo a su vez esencial en las reacciones enzimáticas de transmetilación celular. La S-adenosil-homocisteína (SAH) representa el principal sustrato en las reacciones de transferencia de grupos metil. La hidrólisis de la SAH produce adenosina y Hcy. Por consiguiente, el incremento de Hcy interfiere con la metilación del DNA (ácido desoxirribonucleico) y la expresión génica, causando pérdida de metilación (hipometilación) del DNA y alteración de la relación SAM/SAH16. Adicionalmente, la Hcy es perjudicial para el organismo, ya que favorece la homocisteinilización de las proteínas¹⁷ (Hcy-p). La Hcy-p representa el proceso mediante el cual la Hcy se une a las proteínas. pudiendo ocurrir este fenómeno de diferentes modos: 1. A través de la oxidación de los grupos sulfhidrilo (SH o grupo tiol/thiol) a nivel de los residuos de cisteína (Cys). Esta reacción esta mediada por la Hcy en su forma libre; proceso denominado Shomocisteinilización de las proteínas (S-Hcv-p)¹⁸. 2. Mediante acilación de los residuos de lisina (Lys) del grupo amino (NH2) de las proteínas; fenómeno conocido como Nhomocisteinilización (N-Hcy-p), mediado por la Hcy-T¹⁹.

La paraoxonasa 1 (PON1) se sintetiza en el hígado y se encuentra estrechamente vinculada a la actividad de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Los polimorfismos del gen PON1 infieren propiedades funcionales a la enzima PON1, afectando tanto su actividad tiolactonasa²⁰, como su concentración²¹.

El incremento de la dimetilarginina asimétrica (ADMA) al inhibir la eNOS y la NG-metil-L-arginina (L-NMA) altera la síntesis de NO²². La ADMA se produce como consecuencia de la proteólisis. Los residuos de arginina (Arg) dimetilados se forman postraslacionalmente mediante la transferencia de los grupos metil de la SAM, relacionando de esta manera la producción de ADMA con la formación de Hcy²³. Se ha descrito relación entre el incremento de ADMA y disfunción endotelial.

Los seres humanos poseen dos genes que regulan la actividad de las DDAH (dimetilarginina dimetilaminohidrolasas): DDAH1 y DDAH2. El gen DDAH2 se expresa predominantemente en los tejidos mejor vascularizados²⁴. Se han reportado efectos dosis dependientes de la concentración de Hcy en las células endoteliales en relación con: 1. Incremento de ADMA. 2. Disminución de la actividad de las DDAH. 3. Menor biodisponibilidad de NO^{15,25}.

Evaluamos la contribución de los polimorfismos más relevantes de los genes que codifican las enzimas primordiales en el metabolismo de la Hcy, así como la concentración de Hcy-p en fragmentos de AMI. Algunos hallazgos *in vitro* relacionan la Hcy, el grado de metilación del promotor del gen DDAH2, la enzima DDAH2 y la expresión del gen eNOS²⁵. En consecuencia, analizamos la tHcy, la concentración de Hcy-p y su relación con los diferentes genotipos, correlacionándolos a su vez, con el grado de metilación del promotor del gen DDAH2.



MARCO CONCEPTUAL

"Logic is not Truth". "One cannot rely on logic; one must perform experiments to discover the truth".

Seymour Glagov (1925-2008).

1. Escenario actual de la aterosclerosis

Han trascurrido ya seis décadas desde que se inició el *Framingham Heart Study* (FHS)²⁶. No obstante, las ECV continúan liderando la mortalidad en ambos géneros, siendo la EC y el accidente cerebrovascular (ACV), la primera y segunda causa de muerte, respectivamente^{27,28} (Figura 1).



Figura 1. Escenario aterosclerótico. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la causa numero uno de la mortalidad global del planeta. Mueren más personas anualmente en el mundo por ECV que por cualquier otra causa⁴. Imagen de conjunto (margen superior) tomada de: *Closing the gap in a generation: health equity through action on the social determinants of health. Final Report of the Commission on Social Determinants of Health. Geneva, World Health Organization (WHO). CSDH 2008. http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563703_eng.pdf.*

1.1 Panorama mundial de las enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades del sistema circulatorio constituyen un problema de salud de primer orden, ya que a su radical importancia en los países desarrollados, se adiciona su creciente relevancia en los países en vías de desarrollo. Gran número de individuos con

alto riesgo de presentar eventos cardiovasculares residen en países de nivel económico medio o bajo, en los que ~80% de los fallecimientos se generan como consecuencia de las ECV²⁷. Las prácticas insalubres propias de los países industrializados se vienen arraigando de forma creciente en los países en vías de desarrollo.

Cinco de las diez principales amenazas mundiales para la salud están relacionadas con las ECV^{29,30} (Figura 2). Aproximadamente 9.4 millones de muertes cada año (16.5% de los fallecimientos) son atribuibles a la hipertensión arterial (HTA), 51% de las cuales son consecuencia del ACV y el 45% de la EC⁴. Pese a ello, los FR clásicos implicados en la génesis de las ECV, no predicen con acierto los eventos cardiovasculares³¹.

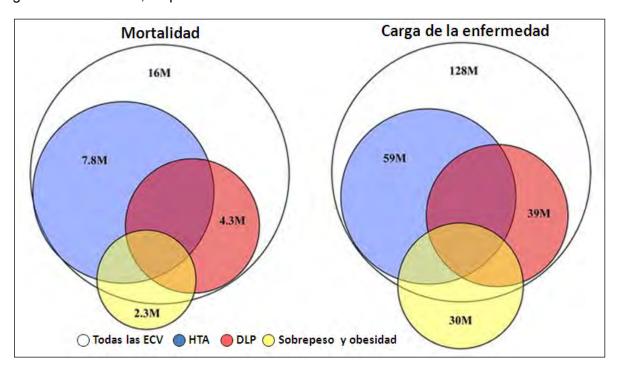


Figura 2. Morbilidad y mortalidad atribuible a las enfermedades cardiovasculares. ECV (enfermedades cardiovasculares); HTA (hipertensión arterial); DLP (dislipemia). Adaptada de: *Plos Medicine. PLoS Med.* 2005;2(5):e148³⁰.

Se estima que menos de la mitad de las personas que presentan algún FR para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (FRECV) conoce su diagnóstico, que menos de la mitad de estos individuos recibe tratamiento específico y que a su vez, menos de la mitad de los pacientes logran los objetivos terapéuticos recomendados en las guías de la práctica clínica²⁹.

El coste social, económico y humano de las ECV continúa ascendiendo de forma exponencial. Según los estimativos, 17.3 millones de personas fallecieron como consecuencia de las ECV en 2008, representando el 30% de todas las muertes. De estos decesos, 7.3 millones fueron debidos a EC y 6.2 millones al ACV. De acuerdo con las previsiones, el número de personas que fallece por ECV (principalmente por EC y ACV) se incrementará hasta alcanzar los 23.3 millones de muertes en 2030⁴. Se prevé que las ECV serán en el año 2020 la causa más importante de muerte y de años de vida ajustados a la discapacidad²⁷, al mismo tiempo que continuarán liderando la mortalidad global del planeta^{4,32}. En el año 2008, la WHO (*World Health Organization*), enfatizó que de no adoptar medidas oportunas, a partir del año 2015 cerca de 28 millones de personas morirían cada año en el mundo como consecuencia de las ECV⁴.

Se afirmó en la Declaración de Victoria³³: "Muchas enfermedades cardiovasculares pueden prevenirse. Poseemos los conocimientos científicos necesarios para crear un mundo prácticamente libre de enfermedad coronaria y de accidentes cerebrovasculares". Los principios enunciados en la "Declaración de Luxemburgo"³⁴, en el EHHC³⁵ (*European Heart Health Charter*) y en la AHA^{36,37} (*American Heart Association*) encaminados hacia la modificación del estilo de vida para alcanzar la salud cardiovascular han sido contundentes. Es asombroso que con el conocimiento adquirido, persista tan inadmisible prevalencia de hábitos malsanos, HTA, obesidad y dislipemia (DLP), insuficiente e inadecuadamente controlada en todo el mundo^{4,32}.

1.2 Las enfermedades cardiovasculares en los EE. UU. de América

El reporte estadístico del año 2013 de la AHA³⁸, reveló que aunque la tasa de mortalidad por ECV declinó entre 1999 y 2009, las ECV continúan siendo la mayor causa de mortalidad (en ambos géneros), siendo responsables de una de cada tres muertes en los EE.UU. de América. Según este reporte, en 2009 más de 2150 americanos fallecieron diariamente como consecuencia de las ECV (en promedio una muerte cada 40 segundos).

La EC causó una de cada 6 muertes. Cada 34 segundos un americano presentó un evento coronario, y cada minuto un americano murió como consecuencia de dicho episodio.

1.3 Las enfermedades cardiovasculares en Europa

Las ECV siguen liderando la mortalidad en Europa y en la Unión Europea (UE) en ambos géneros, ocasionando más de 4 millones de muertes cada año en Europa (1.9 millones en la UE), coexistiendo asimismo amplia diferencia en las tasas de mortalidad entre los diferentes países del continente europeo. Las ECV causan el 47% de todas las muertes en Europa (40% en la UE). La EC y el ACV constituyen la primera y segunda causa de mortalidad respectivamente, tanto en Europa como en la UE²⁸.

1.4 Las enfermedades cardiovasculares en España y Canarias

En el contexto mundial, España no está al margen de la alarmante situación de salud que entrañan las ECV. Con todo ello, España presenta entre la mitad y la cuarta parte de la incidencia de ECV que en los países del Norte, Este y Oeste de Europa, EE.UU y otras naciones anglosajonas, aunque la prevalencia de FRECV en la población española es semejante a la de estos países (paradoja del sur de Europa)^{28,39}. No obstante, se prevé que España tendrá proporcionalmente la población de mayor edad del mundo en pocas décadas (Figura 3), con lo que se espera que incremente la morbimortalidad por enfermedades crónicas, entre las que se cuentan las ECV, verbigracia la EC⁴⁰.

En España desde el año 1996, la EC ha ocasionado el mayor número de muertes por ECV, con predominio de los hombres. Esta hegemonía de la EC sobre el ACV se ha atribuido al descenso relativo de la mortalidad cerebrovascular respecto a la mortalidad coronaria, invirtiéndose así el llamado "patrón mediterráneo de mortalidad cardiovascular", en el que predominaba el AVC. En las mujeres por el contrario, continúa prevaleciendo el ACV sobre la EC³⁹. En la Comunidad Autónoma de Canarias, las ECV siguen cobrando el mayor número de víctimas mortales, duplicando las tasas de mortalidad por ECV de otras regiones del territorio español como Gerona.

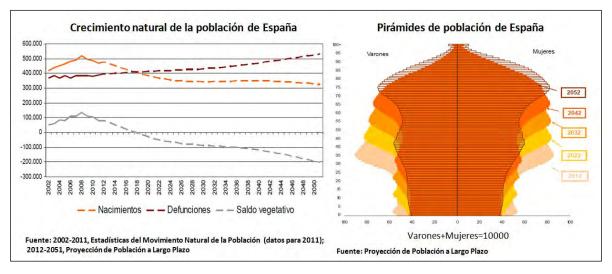


Figura 3. Proyecciones de población 2012-2052 para España. La simulación de la proyección a largo plazo de la población española elaborada por el Instituto Nacional de Estadistica (INE)(1), muestra el proceso de envejecimiento al que se enfrenta nuestra estructura demográfica, el cual se ve acelerado por el descenso de la natalidad y los saldos migratorios negativos. Los mayores crecimientos de población se concentrarían en las edades avanzadas. Concretamente, el grupo de edad de mayores de 64 años pasaría a constituir el 37% de la población total de España en 2052. Una estructura demográfica cada vez más envejecida produciría un continuo crecimiento del número anual de defunciones. Así, en los próximos 40 años morirían en España unos 17,9 millones de personas, un 34% más que en los últimos 40 años. Las previsiones ofrecen una perspectiva de crecimiento natural negativo desde 2018. Si se mantuvieran las actuales tendencias⁽²⁾, la estructura de la población de España nos llevaría a la pérdida progresiva de habitantes en las próximas décadas. Gráficas adaptadas de: INEbase-www.ine.es. Nota de Prensa INE de 19 de noviembre de 2012 (actualizada el 04/12/ 2012). www.ine.es/prensa/prensa.htm. La proyección de la población de España a largo plazo puede consultarse en: http://www.ine.es. (1)Metodología general del cálculo basada en el método clásico de componentes aplicado de acuerdo a un modelo de proyección multirregional. (2)Las proyecciones de población elaboradas por el INE constituyen una simulación estadística del tamaño y estructura demográfica de la población que residiría en España en los próximos años, en caso de mantenerse las tendencias demográficas actuales. Estos datos reflejan el efecto que sobre la población futura tendría nuestra presente estructura poblacional y los comportamientos demográficos observados a la fecha.

Las enfermedades del sistema circulatorio continúan siendo en España la principal causa de muerte, si bien han mantenido una tendencia discretamente descendente en los dos últimos años (–0,7%)⁴¹. Adicionalmente, algunos FRECV como el sobrepeso, la DLP, la diabetes mellitus (DM) y el tabaquismo, siguen entorpeciendo el descenso de la mortalidad por EC en España⁴².

2. Enfoque actual de la aterosclerosis

Donald D. Heistad al iniciar su ponencia: *Oxidative Stress and Vascular Disease* durante la *2005 Duff Memorial Lecture*⁴³, describió los cambios estructurales y funcionales de la ATS caracterizados por depósito de lípidos, fibrosis y calcificación de las lesiones ateroscleróticas⁴⁴, afirmando: "*Based on the histological appearance of arteries, logic would dictate that these vascular changes are irreversible. But Mark Armstrong my mentor in studies of atherosclerosis, with Emory Warner and William Connor, provided landmark morphometric evidence in primates that atherosclerosis can regress.* Desde entonces, el estudio clásico de Armstrong y cols. ha inspirado a multitud de generaciones de investigadores a profundizar en el conocimiento de la ATS en los humanos.

Debido a que durante décadas se atribuyó al incremento del colesterol plasmático, en particular al colesterol trasportado en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) como el principal FR en la ATS⁴⁶, la noción del proceso aterogénico se consolidó a través de los años, como el depósito pasivo de lípidos en el interior de la pared arterial. Sin embargo, la enfermedad aterosclerótica es más que esto. El concepto actual involucra a la ATS como una enfermedad sistémica crónica que acontece como respuesta a la disfunción del endotelio vascular y está caracterizada por presentar un prototipo inflamatorio y fibroproliferativo, el cual presupone un proceso dinámico en el que están implicados la formación de la placa ateromatosa, su ruptura y la trombosis del vaso sanguíneo. En la ATS participan diversos fenómenos como la activación celular (infiltración de macrófagos) y la liberación de citocinas proinflamatorias⁴⁴ (Figura 4).

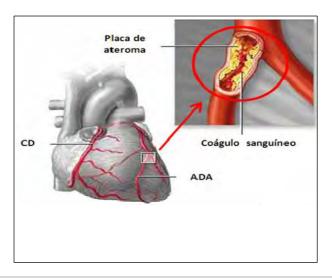


Figura 4. Aterosclerosis coronaria. La aterosclerosis (ATS) es una enfermedad progresiva de las arterias que ocasiona reducción del flujo sanguíneo tisular. La restricción del flujo sanguíneo al músculo cardiaco es responsable del síndrome coronario agudo. Con frecuencia la ATS debuta por sus complicaciones. CD (arteria coronaria derecha); ADA (arteria descendente anterior). Imagen adaptada de: http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ A.D.A.M. Quality.

La ATS es un proceso complejo (poligénico y multifactorial) parcialmente hereditario, en el que la manifestación individual de la enfermedad depende de la interacción entre los genes y su entorno. Este proceso altera el endotelio vascular y origina un fenotipo específico, el cual representa el punto de partida de las ECV ateroscleróticas. Los rasgos

complejos se heredan de forma no convencional, entendiendo por ello, un fenómeno que no se rige *ad integrum* por las leyes de la herencia mendeliana^{47,48}. Entendemos por enfermedades complejas, aquellas nosologías que no son el resultado obvio de las mutaciones o de la influencia ambiental única⁴⁹. Desconocemos en su totalidad los genes involucrados en dicho proceso^{7,8}. Gran número de factores del crecimiento, citocinas y moléculas vasoactivas participan en la ATS⁴⁴. Nuestra habilidad para controlar la expresión de los genes que codifican estas moléculas y los blancos específicos de algunos tipos celulares permitirán mejorar la comprensión del proceso aterosclerótico.

La ATS y la aterotrombosis (ATB) son patologías estrechamente relacionadas, coexistiendo ambas enfermedades en más de un lecho vascular de un mismo paciente⁵⁰ (Figura 5).

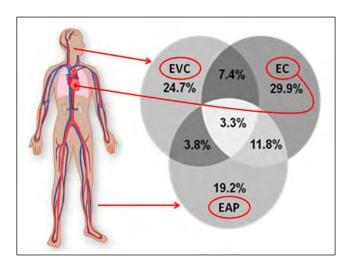


Figura 5. Manifestaciones de la aterotrombosis. La aterotrombosis habitualmente coexiste en varios territorios arteriales. EVC (enfermedad vascular cerebral/enfermedad cerebrovascular); EC (enfermedad coronaria); EAP (enfermedad arterial periférica/enfermedad vascular periférica). Izquierda. Imagen tomada de http://www.texasheartinstitute.org/HIC/Anatomy/. Derecha. Adaptada de: *Coccheri S. Eur Heart J.* 1998;19(Suppl):1268⁵⁰.

El incremento de la actividad procoagulante y/o la disminución de la capacidad fibrinolítica, contribuyen a la progresión de la placa ateromatosa, favoreciendo la trombogénesis y la oclusión de las arterias coronarias⁴⁷.

El avance en el conocimiento de la ATB no ha conseguido disminuir la prevalencia de las ECV en la población general. Las estatinas se han perfilado como terapia eficaz en la

prevención primaria y secundaria de las ECV⁵¹. Pese al tratamiento con estatinas y a la reducción farmacológica de las LDL, gran proporción de individuos continúa presentando eventos cardiovasculares^{51,52}. Cerca de la mitad de los pacientes que mueren por ECV no presentan alteraciones significativas en el metabolismo lipídico, ni FR independientes que expliquen la génesis de las ECV y sus temidas complicaciones⁵³.

En este contexto, el concepto de que la variabilidad genética desempeñe un papel determinante del riesgo coronario resulta bastante atractivo. Es por esta razón que se están buscando nexos con las ECV en el ámbito de la genética molecular. Las nuevas técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico genético, posibilitan el estudio de los mecanismos que subyacen a la predisposición individual y familiar a padecer determinadas enfermedades. Se han descrito numerosos alelos de riesgo en la génesis de las ECV y la lista de genes candidatos no cesa de ampliarse. No obstante, nuestro conocimiento presenta importantes limitaciones. En la mayoría de los casos, su relación con el riesgo coronario es apenas modesto. A pesar de las limitaciones existentes, está tomando forma la hipótesis de que el riesgo de padecer EC es función del número de polimorfismos desfavorables que porta cada individuo⁴⁸. Por consiguiente, los polimorfismos adquieren especial relevancia en el contexto de las interacciones con otros factores (genéticos y/o ambientales) y con el conjunto de genes del organismo⁴⁷.

La última década ha estado marcada por creciente interés hacia la caracterización de las bases genéticas de la trombosis arterial. Se han identificado numerosas variantes genéticas relacionadas con la tríada patogénica de Virchow (1821-1902) descrita hace más de 150 años. No sin razón se afirma que: "el hombre vive con aterosclerosis, pero muere de trombosis"⁵². La genética se ha revelado como una disciplina imprescindible en el progreso de las ciencias médicas⁵⁴. El conocimiento etiológico y fisiopatológico de la enfermedad aterotrombótica se acrecienta día a día, si bien, desconocemos los aspectos fundamentales que nos permiten prevenir su aparición o curarla⁴⁸. La biomedicina ha

experimentado en las últimas cinco décadas avances sorprendentes. La investigación no cesa en la búsqueda de nuevos logros en el ámbito de la genética y de la biología molecular. En el contexto actual, estas disciplinas constituyen una necesidad apremiante para los profesionales implicados en las ciencias de la salud, ya que este campo de acción cobra cada vez más relevancia en la práctica clínica diaria.

En la medicina cardiovascular moderna, esta circunstancia ha sido particularmente trascendente. La incorporación a las opciones técnicas actuales de los novedosos conocimientos en biología molecular, inmunología, genómica (estudio de la organización molecular del DNA y su cartografía física), proteómica (estudio del proteoma o conjunto de proteínas presentes en las células) y metabolómica (estudio del estado metabólico de los fluidos y tejidos), ha modificado sustancialmente nuestro enfoque biológico de la ATS y ha estimulado la investigación de nuevos mecanismos, biomarcadores y blancos terapéuticos⁵⁵. El conjunto de metabolitos del organismo suministra información del fenotipo, ya que los metabolitos constituyen el producto final de la transcripción génica y por ende, reflejan de forma más exacta la actividad celular o el fenotipo funcional. Luego, el metaboloma representa el escenario idóneo para el estudio de los procesos celulares en condiciones tanto fisiológicas como patológicas⁵⁶.

Hoy en día no es suficiente con la aportación de técnicas terapéuticas por muy sofisticadas que estas sean. Urge una novedosa percepción de la ATS, de los FR implicados en su génesis, así como de aquellas circunstancias que eviten la progresión de la enfermedad aterosclerótica y sus infortunadas consecuencias.

El secuenciamiento del genoma humano supuso un gran avance en el conocimiento del esqueleto molecular del DNA. No obstante, el genoma *per se,* no explica la complejidad de las funciones biológicas de los diferentes órganos y tejidos, ni la diversidad de las patologías que los afectan. Por lo tanto, se ha inferido la existencia de un nivel adicional de regulación y desregulación del genoma en caso de enfermedad. Uno de estos

niveles adicionales de complejidad lo explica la epigenética, la disciplina que estudia las modificaciones químicas que experimenta el DNA y las proteínas que lo regulan. En consecuencia, el desentrañamiento de la función de los genes (epigenoma), marca la senda del interés primordial de la investigación contemporánea⁵⁷⁻⁶⁰.

Las enfermedades complejas como la ATS y las ECV (EC), representan modelos ideales para los estudios de genómica. La aproximación genómica permite identificar infinidad de genes y vías de señalización en diferentes fases evolutivas de la enfermedad, ofreciendo una alternativa más eficiente en el conocimiento de los procesos implicados en su origen. Entender las ECV a escala genómica permite estratificar más adecuadamente los pacientes, en aras a la obtención de terapias más específicas e individualizadas. No obstante, tan importante como la información que aportan estas ciencias, es el hecho que resulte imprescindible desarrollar instrumentos destinados a analizar y a evaluar con eficiencia tan amplia información. En este ámbito, la bioinformática de alto rendimiento y la biología computacional se cristalizan como herramientas en el alcance de estos objetivos⁶¹. Con todo ello, la biología del sistema cardiovascular se halla aún en sus inicios⁶²⁻⁶⁵.

2.1 La aterosclerosis como prototipo de enfermedad inflamatoria

La presunción de que la ATS morfológicamente constituía una enfermedad inflamatoria se derivó de los estudios en modelos experimentales. Friedman y cols. 66, reportaron por primera vez el nexo existente entre inflamación y cardiopatía isquémica en 1974. Al margen de algunas consideraciones metodológicas, el mensaje transmitido por estos autores, es que la inflamación en la fisiopatología del IAM permanece vigente. Posteriormente, Bevilacqua 67, demostró que las citocinas favorecían la adhesividad de los leucocitos al endotelio vascular. Este hallazgo marcó un hito en la comprensión de la inflamación en la enfermedad aterosclerótica. Estudios ulteriores sugirieron que el endotelio vascular era el órgano diana donde se generaba la respuesta inflamatoria. En los

últimos años, gran número de trabajos científicos han destacado la trascendencia de las células del sistema inmunitario y de las citocinas en la aterogénesis⁴⁴.

La lesión ateromatosa más temprana, la denominada estría grasa, constituye una lesión manifiestamente inflamatoria compuesta esencialmente por monocitos (macrófagos), linfocitos T, lípidos y detritos celulares. La estría grasa constituye el centro de la lesión ateromatosa, el cual se necrosa como consecuencia de la apoptosis (muerte celular programada), de la actividad proteolítica y del acumulo de lípidos⁴⁴ (Figura 6).

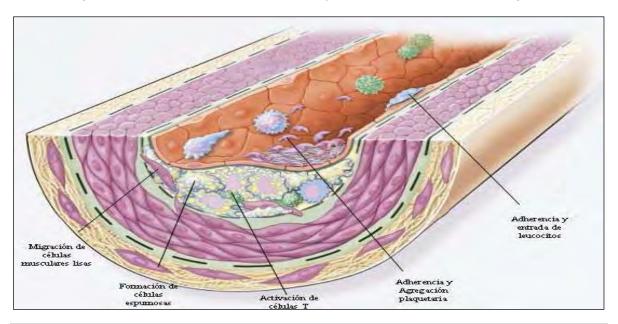


Figura 6. Formación de la estría grasa. La estría grasa está compuesta por monocitos, macrófagos (células espumosas) y linfocitos, a los cuales se unen posteriormente las células musculares lisas de los vasos sanguíneos (VSMC). Los pasos involucrados en este proceso incluyen: 1. Migración de las VSMC. 2. Activación de las células T. 3. Agregación plaquetaria. Modificada de: *Ross R. N Engl J Med. 1999;340(2):115-126*⁴⁴.

La inflamación ha despertado enorme y creciente interés en el desarrollo y progresión de las ECV. Los marcadores séricos de la respuesta inflamatoria se han convertido en indicadores de gran importancia. A su vez, los posibles efectos pleiotrópicos de ciertos fármacos con inesperados efectos antiinflamatorios y por tanto antiaterogénicos como las estatinas, han abierto nuevas vías de investigación en este campo¹⁵. Existe progresiva evidencia científica que señala que los mecanismos implicados en la transformación de la placa de ateroma no complicada, en la lesión ulcerada y hemorrágica

responsable del síndrome coronario agudo (SCA), es consecuencia de la respuesta inflamatoria⁴⁴ (Figura 7).

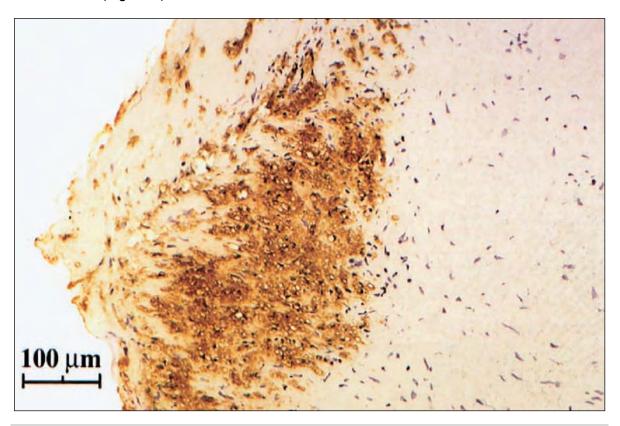


Figura 7. Identificación de macrófagos mediante tinción inmunológica en muestras de aterectomía coronaria. Tinción con anticuerpos monoclonales anti-macrófagos humanos (inmunoperoxidasa) utilizada en el estudio de Moreno y cols. (1), para cuantificar el área ocupada por los macrófagos en placas ateromatosas de pacientes con enfermedad coronaria (EC) sintomática, intervenidos mediante aterectomía coronaria direccional (DCA). Microfotografía adaptada de: (1) Moreno PR, Murcia AM, Palacios IF, Leon MN, Bernardi VH, Fuster V, Fallon JT. Coronary Composition and Macrophage Infiltration in Atherectomy Specimens From Patients With Diabetes Mellitus. Circulation. 2000;102:2180-2184.

Las diferencias en los determinantes genéticos de la respuesta inflamatoria explican el porqué algunas personas (aunque no todas) desarrollan ciertas enfermedades y el motivo por el cual algunos individuos presentan mayor respuesta inflamatoria. La gravedad y la persistencia de la inflamación están determinadas genéticamente a través de diferentes vías: 1. Expresión de los genes involucrados en la respuesta inflamatoria como las citocinas y las moléculas de adhesión celular (CAMs). 2. La capacidad de respuesta de los monocitos y de los linfocitos. 3. El estímulo inflamatorio inducido por las LDL oxidadas

Relevancia de polimorfismos génicos y la S-homocisteína en la epigénesis en arteria mamaria interna y aorta (LDLox), las especies reactivas del oxígeno (ROS), las endotoxinas y los lipopolisacaridos (LPS)^{43,68}.

2.1.1 Placa aterosclerótica vulnerable e inflamación

Hoy se acepta que la inflamación de la pared arterial participa en las diferentes fases de la lesión aterosclerótica. Pese a ello, se desconocen los mecanismos que subyacen a la inestabilidad de la placa y su ruptura, siendo la caracterización de la placa vulnerable in vivo en la práctica diaria, uno de los grandes retos de la medicina cardiovascular actual. El concepto de placa vulnerable ha evolucionado desde los reportes iniciales que relacionaron la ruptura de la placa y la trombosis coronaria como la principal causa de IAM y muerte súbita de origen cardiaco. En la última década ha habido sustanciales progresos en las técnicas de imagen que evalúan la morfología de la pared arterial, la composición de la placa y la inflamación. El entusiasmo en el desarrollo de las nuevas modalidades de imagen procede de las ciencias básicas. Los estudios morfológicos de la placa han encontrado relación entre la inestabilidad de la placa, la magnitud del núcleo necrótico, la severidad de la inflamación y el adelgazamiento de la capa fibrosa. Se ha subrayado además, la relevancia de analizar la estenosis de la arteria conjuntamente con la morfología de la placa. De otro lado, existe creciente evidencia que relaciona la neovascularización de los vasa vasorum con el inicio, progresión y complicación de la placa aterosclerótica (Figura 8).

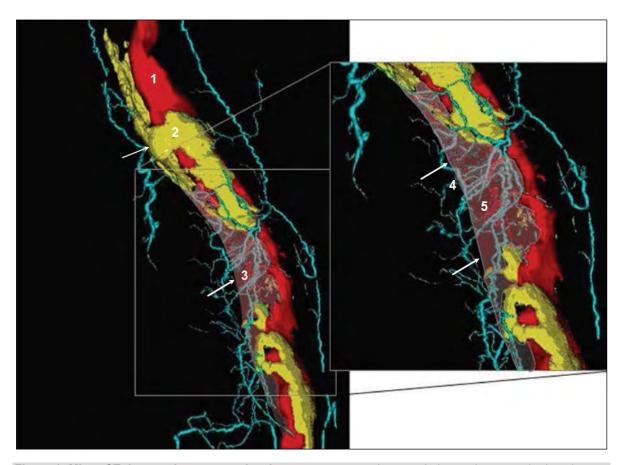


Figura 8. Micro-CT de una placa coronaria y los vasa vasorum. Imagen de la arteria coronaria derecha que muestra la luz del vaso en matiz rojo (1); calcificación (2); las áreas de la placa calcificadas y no calcificadas (transparentes) se señalan con flechas. Los vasa vasorum externos exhiben matiz azul claro y los vasa vasorum internos (originados directamente de la luz del vaso) presentan color rojo. Micro-CT (microcomputed tomography). Crédito de imagen: Gössl M, Versari D, Hildebrandt HA, Bajanowski T, Sangiorgi G, Erbel R, Ritman EL, Lerman LO, A Lerman. Segmental heterogeneity of vasa vasorum neovascularization in human coronary atherosclerosis. JACC. 2010;3(1):32-40. Imagen tomada de: Sun Z. Atherosclerosis and Atheroma Plaque Rupture: Imaging Modalities in the Visualization of Vasa Vasorum and Atherosclerotic Plaques. Hindawi Publishing Corporation. The Scientific World Journal. Volume 2014, Article ID 312764, 12 pages. http://dx.doi.org/10.1155/2014/312764.

Las técnicas de imagen actuales empleadas en la práctica clínica ofrecen escasa información sobre la biología de la placa y el riesgo de ruptura de la misma. Hasta ahora, ninguna técnica aisladamente evalúa con precisión la ATS humana. Se presume que la integración de varios métodos de imagen perfeccione nuestro conocimiento sobre los mecanismos implicados en la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica. Las nuevas técnicas de imagen invasivas y no invasivas, entre las que se cuentan: el *Micro-CT* (microcomputed tomography), el CEUS (contrast-enhanced ultrasound), el IVUS (intravascular ultrasound), el NIRS (Near-Infrared Spectroscopy System), la OCT (optical

coherence tomography) y la CE-MRI (contrast-enhanced magnetic resonance imaging), han permitido afinar el estudio de la morfología de la pared arterial, la composición de la placa y la respuesta inflamatoria.

Entre estas modalidades, las técnicas de imagen molecular ofrecen la posibilidad de valorar los procesos biológicos, tales como la actividad celular y los biomarcadores moleculares *in vivo* y en el tiempo (Figura 9).

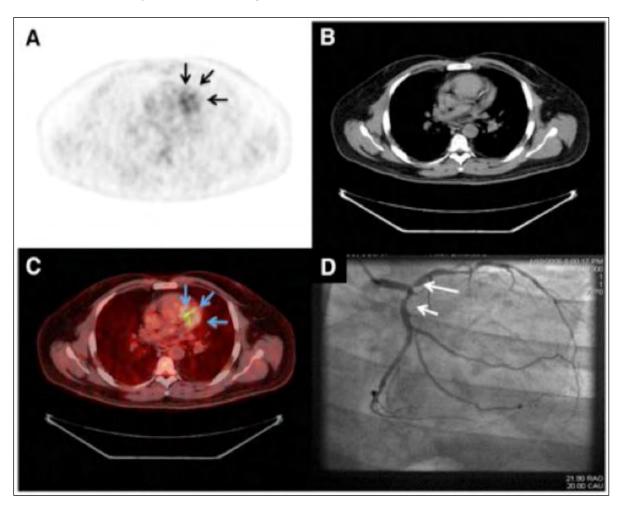


Figura 9. Placa coronaria vulnerable. Evaluación de la actividad inflamatoria de las placas coronarias (flechas) mediante ¹⁸F-FDG (análogo de la glucosa) y otras técnicas de imagen representativas: A, tomografía con emisión de positrones (PET); B, tomografía computarizada (CT); C, PET/CT; D, angiografía coronaria. El ¹⁸F-FDG es captado por las células metabólicamente activas, especialmente por los macrófagos y las células espumosas. Crédito de imagen: *Wykrzykowska J, Lehman S, Williams G, Parker JA, Palmer MR, Varkey S, Kolodny G, Laham R. The glucose analogue 18F-FDG is taken up by metabolically active cells, especially by macrophages and foam cells, and thus reports on inflammatory activity in atherosclerotic lesions. J Nucl Med. 2009;50:563-568.* Imágenes tomadas de: *Sun Z. Atherosclerosis and Atheroma Plaque Rupture: Imaging Modalities in the Visualization of Vasa Vasorum and Atherosclerotic Plaques. Hindawi Publishing Corporation. The Scientific World Journal. Volume 2014, Article ID 312764, 12 pages. http://dx.doi.org/10.1155/2014/312764.*

Estas técnicas permiten además evaluar los resultados del tratamiento sobre la inflamación vascular, la estabilidad y/o la regresión de la placa aterosclerótica. Pese a los enunciados anteriores, persisten enigmas aun no resueltos antes de que las técnicas de imagen emergentes sean incorporadas en la evaluación de la placa vulnerable en el ejercicio médico rutinario. Este hecho obedece entre otros factores, a la falta de la relación causa-efecto reportada en los estudios tanto en animales como en humanos. Se prevé que el avance en este campo requerirá relevantes y selectos modelos de investigación cardiovascular traslacional, aunado al desarrollo de ensayos clínicos prospectivos que demuestren que estas nuevas modalidades favorecen el diagnostico, el seguimiento y el pronóstico de los enfermos en el ámbito clínico. En esta dirección, la medicina cardiovascular debe beneficiarse de los progresos en cancerología, en donde las técnicas de imagen de los biomarcadores ya han sido incorporadas en la práctica clínica diaria. Aún asi, existe consenso en que reviste mayor trascendencia prevenir la formación de la placa aterosclerótica que tratarla.

2.2 Hipótesis oxidativa de la aterosclerosis

En condiciones fisiológicas la producción de NO' predomina sobre la producción de anión superóxido manteniendo bajo control el estrés oxidativo. Si la producción de NO' es insuficiente y/o la producción de ROS es excesiva, se altera este equilibrio. El aumento de las ROS y la alteración de los mecanismos de defensa antioxidantes constituyen el fundamento de la hipótesis oxidativa de la ATS. El incremento de superóxidos y la oxidación de las LDL, representan hallazgos cardinales del fenotipo vascular de la ATS humana.

2.2.1 Estrés oxidativo y enfermedad cardiovascular

La implicación de las ROS en las vías de señalización celular y en la fisiopatología de las ECV, es uno de los aspectos más trascendentales en la biología del sistema cardiovascular⁴³. Existe incremento del estrés oxidativo en diferentes enfermedades como

la EC, la HTA, la insuficiencia cardiaca, el ACV, la DM y el síndrome metabólico⁶⁹. El estrés oxidativo desempeña una función crucial en la disfunción del endotelio vascular inherente a estas enfermedades, ya que los superóxidos inactivan el NO.

El endotelio disfuncionante aumenta la permeabilidad de las LDL. Las LDL ingresan al espacio subendotelial, en donde interactúan con las proteínas de la matriz extracelular (MEC), convirtiéndosen en blanco del proceso oxidativo⁴³. Cualquier sistema enzimático en el que se generen radicales libres, puede estar involucrado en la oxidación de las LDL. El incremento del estrés oxidativo generado por la falta de acoplamiento enzimático de la eNOS, el aumento de las ROS y la fosforilación de la eNOS, explican parcialmente el fenómeno de oxidación de las LDL. El mecanismo de formación de las LDL mínimamente oxidadas (LDLmox) consta al menos de tres pasos: 1. El sembrado (seeding) de las LDL con productos del metabolismo del ácido araquidónico y los ésteres de colesterol peroxidados⁷⁰. 2. El traslado de las LDL al espacio subendotelial, en donde se acumulan también las ROS. 3. La oxidación de los fosfolípidos de las LDL, cuando se alcanza cierto umbral de ROS⁷¹. No obstante, las LDLox no son la única explicación a la disfunción del endotelio. El atrapamiento de las LDLox en el interior de la pared arterial y la expresión de diversos genes proinflamatorios aumentan la respuesta inflamatoria a nivel celular. En consecuencia, los polimorfismos involucrados en el proceso oxidativo de las LDL constituyen FR primordiales en la génesis de las ECV^{43,72}.

2.2.2 Superóxidos y función endotelial

En las dos últimas décadas se ha estudiado extensamente la actividad de los superóxidos en la respuesta vasomotora mediada por el NO*. Los superóxidos, además de otras ROS, actúan sobre el músculo liso vascular independientemente del NO*. Los superóxidos impiden la apertura de los canales de potasio (K⁺) en las VSMC, predisponiendo a la vasoconstricción. En los vasos ateroscleróticos existe incremento en la concentración de superóxidos. Los superóxidos activan las metaloproteinasas de la

MEC, encontrándose incremento del estrés oxidativo en las placas ateromatosas de los pacientes con SCA. Aunque en los vasos ateroscleróticos no se altera la expresión de la eNOS, al menos hasta que las lesiones ateroscleróticas están demasiado avanzadas. Por consiguiente, se ha cuestionado que la disminución de la biodisponibilidad de NO sea el punto de partida del endotelio disfuncionante en la ATS⁴³. Se presume que deben concurrir factores adicionales que expliquen la disfunción del endotelio vascular. Diferentes estudios avalan la relevancia de la eNOS en la ATS y en las ECV, encontrando relación entre algunas variantes polimórficas del gen de la eNOS y el riesgo de padecer EC⁶⁸.

El descubrimiento de que las VSMC de los vasos ateroscleróticos representaban una fuente importante de producción de superóxidos, ha sido un hallazgo tan sorpresivo como trascendental, ya que en antaño se asumía que las células inflamatorias de la pared de los vasos ateroscleróticos, eran la fuente primaria de la producción de superóxidos. En las VSMC de los vasos ateroscleróticos, la angiotensina II (ANG II) activa la fosfato nicotinamida adenina dinucleótido oxidasa (NADPH oxidasa), generando superóxidos. Otras enzimas como la xantinooxidasa, la mieloperoxidasa, la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa, el citocromo P450, las oxidasas mitocondriales y la cadena transportadora de electrones mitocondrial, también están involucradas en este proceso. Si bien existe amplia evidencia que relaciona el estrés oxidativo y las ECV ateroscleróticas, las intervenciones que atenúan el estrés oxidativo, no se traducen en los beneficios esperados⁴³.

2.2.3 Estrés oxidativo y homocisteína

Uno de los mecanismos que explican los efectos perjudiciales de la Hcy, es su capacidad para generar ROS e incrementar el estrés oxidativo (Figura 10). Sharma y cols.⁷³, han sugerido que la oxidación promovida por la Hcy obedece a la menor capacidad de las células para eliminar el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y otros lípidos peroxidados, como consecuencia de la alteración de las enzimas antioxidantes intracelulares.

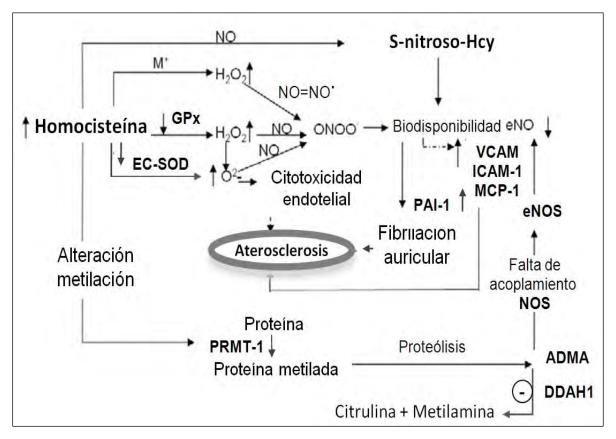


Figura 10. Homocisteína y estrés oxidativo. La hiperhomocisteinemia incrementa el estrés oxidativo por diferentes vías. NO (óxido nítrico); S-nitroso-Hcy (S-nitroso-homocisteína); EC-SOD (superoxido dismutasa extracelular); H₂O₂ (peróxido de hidrógeno); GPx (glutatión peroxidasa); O (oxígeno); VCAM (moléculas de adhesión de las células vasculares); ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1); MCP-1 (sustancia quimiotáctica plaquetaria 1); PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno tisular 1); eNO (NO endotelial); eNOS (sintasa endotelial del óxido nítrico); NOS (sintasas del óxido nítrico); PRMT-1 (protein arginine methyltransferase 1 o metiltransferasa de arginina 1); ADMA (dimetilarginina asimétrica); DDAH1 (dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1). Gráfica adaptada de: *Sharma P, et al. Lipids Health Dis. 2006;5(1):1-19*⁷³.

3. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas

3.1 Endotelio y función endotelial

El endotelio es la capa de células que reviste la superficie interna de los vasos sanguíneos de los mamíferos. Esta superficie representa en los humanos un área aproximada de 1.200 metros cuadrados. El endotelio está constituido por células endoteliales (CE) poliédricas acopladas entre sí mediante un sistema de uniones intercelulares. Las CE reposan sobre la membrana basal, la cual está conformada a su vez por las CE. La membrana basal está en contacto estrecho con la intima. La intima es una

estructura de estirpe hematopoyético, cuya población mesenquimal indiferenciada se encuentra inmersa en la MEC. Las células de la intima, son células pluripotenciales con capacidad para diferenciarse en: CE, macrófagos, linfocitos, fibroblastos, VSMC, condrocitos y osteoblastos, entre otra variedad de células. La intima separa el endotelio de la capa media, teniendo como límite externo la lámina limitante elástica interna (LEI). El endotelio está localizado estratégicamente y capta las señales intravasculares trasmitiéndolas a la intima y a la media (Figura 11).

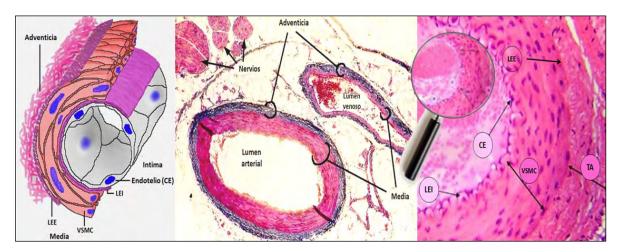


Figura 11. Anatomía microscópica de los vasos sanguíneos. Histológicamente los vasos sanguíneos están formados por tres capas concéntricas o túnicas (intima, media y adventicia). Mediante tinción tricrómica, el colágeno adopta el color azul y el musculo liso toma el color rojo. La intima es la capa más delgada y está constituida por el endotelio y una capa fina de tejido conectivo de soporte. La media es la capa situada entre la intima y la adventicia. La media es la capa muscular y/o elástica, la cual contiene células musculares lisas (VSMC) y tejido elástico en proporción variable. La adventicia es la capa más externa y está compuesta por tejido conectivo fibroadiposo, terminales nerviosas y vasa vasorum. La imagen derecha aunque corresponde a una preparación con hematoxilina-eosina, muestra la ubicación espacial de la lámina limitante elástica interna (LEI) y de la lámina limitante elástica externa (LEE). TA (tunica adventicia). Imágenes adaptadas de: Blue histology. School of Anatomy and Human Biology, Western Australia University (WAU). http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/ e Histology Study Guide Cardiovascular System. SIU, School of Medicine. Board of Trustees, Southern Illinois University. 2011-2012. http://www.siumed.edu/.

Durante décadas se afirmó que el endotelio vascular se limitaba a desempeñar una función de barrera entre la sangre y la pared de los vasos sanguíneos. Hoy sabemos que el endotelio es un órgano dinámico que posee actividad tanto autocrina como paracrina. Las CE son células altamente especializadas con capacidad para adaptar su estado funcional a diversos estímulos: 1. Las CE detectan los cambios físicos inherentes al estrés hemodinámico y a la liberación de diversas moléculas, convirtiéndolos en respuestas

funcionales adaptativas. 2. El endotelio vascular regula la interacción entre las diferentes células que lo componen. 3. El endotelio modula el tránsito de macromoléculas (como las lipoproteínas) y el "tráfico" de las células inflamatorias al interior de los vasos sanguíneos, ejerciendo una función crucial como receptor y mensajero en la trasmisión de diferentes estímulos. 4. El endotelio controla la actividad contráctil, secretora y mitogénica de la pared vascular, mediante la producción de sustancias localmente activas. Esta particularidad le atribuye al endotelio una acción categórica en la homeostasia de los vasos sanguíneos.

Con todo lo anterior, la función más conocida del endotelio es la conservación del tono vascular, el cual garantiza la perfusión tisular mediante la producción de moléculas vasodilatadoras (como el NO' y la prostaciclina) y de sustancias vasoconstrictoras (como la endotelina y la angiotensina II). Estas moléculas ejercen una acción antagónica, la cual depende del tipo de estímulo que recibe el endotelio. El endotelio además de su acción vasodilatadora, ejerce diferentes funciones ateroprotectoras: 1. Actividad antitrombótica. 2. Actividad fibrinolítica. 3. Actividad antiinflamatoria. 4. Actividad antiapoptótica. 5. Actividad antioxidante, imprescindible en la protección de la pared vascular contra el efecto aterogénico de las LDL y de otros agentes lesivos. Todas estas funciones están íntimamente relacionadas con la capacidad del endotelio de producir NO', contrarrestando los efectos de las ROS liberadas en el metabolismo tisular.

3.2 Disfunción endotelial y aterosclerosis

Numerosas observaciones fisiopatológicas llevaron a plantear que el proceso aterosclerótico obedecía a la respuesta a la agresión tisular, por lo que inicialmente se postuló que la lesión del endotelio representaba el primer estadio en la génesis de la ATS. Sin embargo, este concepto ha sido modificado constantemente⁴⁴. La versión más reciente de esta hipótesis hace énfasis en la disfunción del endotelio y en la alteración del equilibrio

oxidativo, más que en el daño endotelial *per se* como desencadenante del proceso aterogénico⁷⁴ (Figura 12).

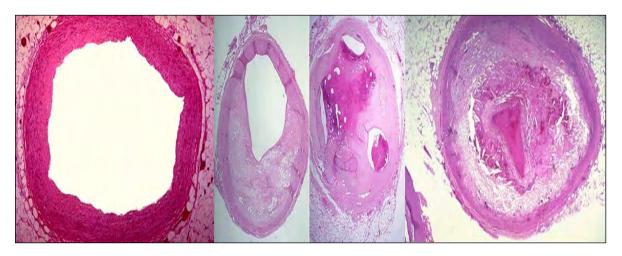


Figura 12. Histopatología coronaria y aterotrombosis. Izquierda. Corte histológico de una arteria coronaria sana. La luz de la arteria es amplia, no existe estrechamiento de su luz por placas de ateroma y la proporción de la capa muscular es normal. Centro izquierda. Aterosclerosis (ATS) coronaria oclusiva (estenosis ~60-70% de la luz del vaso). Placa de ateroma excéntrica. El depósito lipídico está separado de la luz de la arteria coronaria por el casquete de la placa formado por tejido conjuntivo y células musculares lisas. Centro derecha. Aterotrombosis coronaria severa con evidencia de trombosis previa, organización de los trombos, recanalización de los mismos y presencia de tres pequeñas luces remanentes, una de las cuales contiene un trombo reciente. Derecha. Trombosis de una arteria coronaria y oclusión de su escaso lumen residual. Diferentes estudios han relacionado los factores de riesgo cardiovasculares con la disfunción del endotelio vascular, la ATS y sus complicaciones trombóticas. La elevada trombogenicidad sanguínea existente bajo estas condiciones desencadena el síndrome coronario agudo. Imágenes adaptadas de: Blue histology. School of Anatomy and Human Biology, Western Australia University (WAU), http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/e Histology Study Guide Cardiovascular System. Southern Illinois University (SIU) School of Medicine. Board of Trustees, SIU. 2011-2012. http://www.siumed.edu/.

El descubrimiento de que la disfunción del endotelio vascular promueve la formación de la placa ateromatosa y el desarrollo de eventos coronarios agudos, ha sido una de las aportaciones más relevantes en la comprensión de la ATS. Entendemos por disfunción endotelial el desequilibrio de la biodisponibilidad de diversas sustancias de origen endotelial que favorecen la inflamación, el espasmo vascular y el incremento de la permeabilidad vascular. Condiciones estas que favorecen el origen y la progresión de las lesiones arterioscleróticas, la agregación plaquetaria y la trombosis del vaso sanguíneo^{74,75}. El endotelio disfuncionante favorece la proliferación celular a nivel de la pared vascular, generando disbalance entre los agentes vasoactivos y su función protrombótica y antitrombótica. Los agentes proinflamatorios estimulan el endotelio

vascular, aumentando la expresión de diversas CAMs, como la molécula de adhesión de las células vasculares 1 (VCAM-1), los leucocitos circulantes, la sustancia quimiotáctica plaquetaria 1 (MCP-1), la interleucina 1 (IL-1), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)^{44,74} (Figura 13).

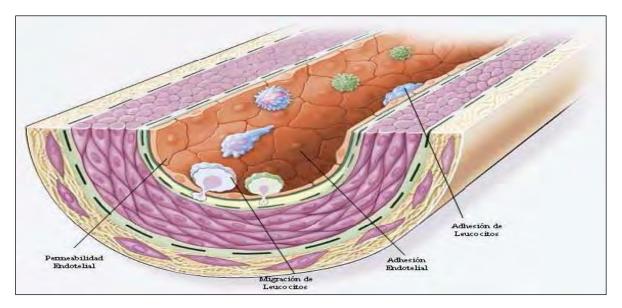


Figura 13. Disfunción endotelial. Los primeros cambios que preceden la formación de las lesiones ateromatosas tienen lugar en el endotelio. Estos cambios incluyen: 1. Incremento de la permeabilidad vascular a las lipoproteínas y a otros componentes del plasma. 2. Aumento de las moléculas de adhesión leucocitaria. 3. Migración de los leucocitos hacia el interior de la pared vascular. Modificada de: *Ross R. N Engl J Med.* 1999;340(2):115-126⁴⁴.

Cuando se limita la respuesta inflamatoria, aumenta el espesor de la pared arterial creándose una placa fibrosa. Luego, a través de un mecanismo compensatorio (remodelación arterial), la pared de la arteria se dilata progresivamente evitando que se reduzca la luz del vaso sanguíneo. Cuando el estímulo inflamatorio persiste, se desplazan los monocitos (macrófagos) y los linfocitos, desde el torrente circulatorio hasta el lugar de la lesión. Estas células liberan enzimas hidrolíticas, citocinas, sustancias quimiotácticas y factores del crecimiento de origen endotelial, produciendo necrosis focal en el área de la lesión aterosclerótica. Los ciclos celulares y humorales repetitivos ocasionan afluencia de células mononucleares, mayor proliferación y migración de las VSMC, así como formación adicional de tejido fibroso. Como consecuencia, se reestructura la lesión ateromatosa

generando una estructura central lipídica y de tejido necrótico que degenera en la lesión aterosclerótica avanzada (Figura 14).

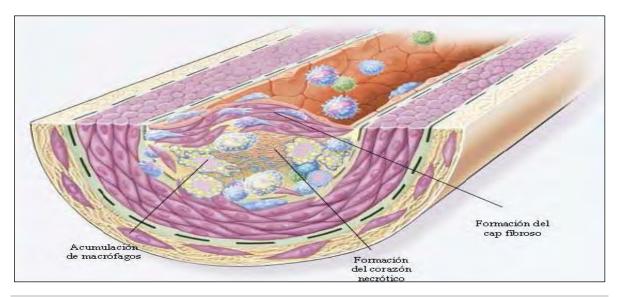


Figura 14. Lesión aterosclerótica avanzada. En la medida en que la estría grasa progresa hacia las lesiones intermedia y avanzada, se forma una capa fibrosa situada entre esta lesión y la luz de la arteria. Este proceso constituye una forma de reparación (respuesta fibrosa) a la agresión vascular. La capa fibrosa está compuesta por una mezcla de leucocitos, lípidos y detritos celulares que conforman el centro necrótico de la lesión. Modificada de: *Ross R. N Engl J Med. 1999;340(2):115-126*⁴⁴.

La estría grasa (Figura 6) progresa hacia la lesión intermedia y avanzada formando una estructura fibrosa que recubre la lesión. La arteria afectada por el proceso aterosclerótico se expande como consecuencia de la migración de los leucocitos promovida por el dinamismo del proceso inflamatorio. No obstante, la pared de la arteria tiene un límite en su capacidad de ensanchamiento. Una vez rebasado ese punto crítico, se disminuye la luz del vaso sanguíneo a expensas del desplazamiento de dicha lesión hacia el lumen de la arteria, alterando la reología vascular. El colágeno producido por las VSMC en el interior de la placa fibrosa del ateroma conserva la estabilidad y firmeza de la placa fibrosa durante esta fase. La respuesta inflamatoria generada por el estímulo inflamatorio altera la regeneración de las fibras de colágeno producido por las VSMC, destruyendo el colágeno existente⁴⁴. La ruptura de la estructura fibrosa de la placa de ateroma (especialmente en los lugares en donde existe mayor afluencia de macrófagos y/o en las regiones de mayor adelgazamiento de la pared vascular) favorece la formación y la

liberación de trombos. Cuando la placa ateromatosa, no se fisura, esta se calcifica progresivamente reduciendo el diámetro del vaso sanguíneo, hasta ocluirlo (Figura 15).

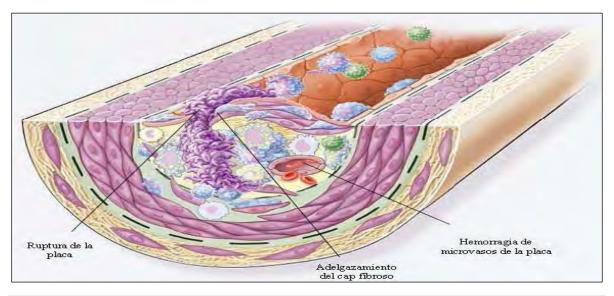


Figura 15. Placa fibrosa inestable. La ruptura de la capa fibrosa y/o su ulceración induce la formación de trombos. Esta ruptura sucede con mayor frecuencia en los lugares de mayor adelgazamiento de la capa fibrosa que recubre la lesión aterosclerótica avanzada. Se presume que el adelgazamiento de la capa fibrosa es consecuencia de la actividad de los macrófagos, los cuales liberan metaloproteinasas y otras enzimas proteolíticas. Estas enzimas degradan la matriz extracelular, generando hemorragia de los *vasa vasorum* de la arteria con la consiguiente oclusión del vaso sanguíneo. Modificada de: *Ross R. N Engl J Med.* 1999;340(2):115-126⁴⁴.

3.3 Citocinas y moléculas de adhesión

Las citocinas son péptidos señalizadores que se producen en respuesta a la agresión de los tejidos, activando la respuesta inflamatoria. Las citocinas actúan a través de sus receptores de alta afinidad, los cuales se expresan en la superficie de las células. Las placas de ateroma son estructuras dinámicas y su estabilidad depende en última instancia, del balance entre la actividad de las citocinas proinflamatorias (las cuales favorecen la progresión y complicación de la placa ateromatosa) y las citocinas antiinflamatorias (que limitan la respuesta inflamatoria local). Durante el proceso inflamatorio, los leucocitos migran a través de la pared de los vasos sanguíneos hacia el tejido extravascular, donde ejercen gran variedad de funciones biológicas. Las citocinas y las CAMs (selectinas, integrinas e inmunoglobulinas), ejercen una función específica en el "tráfico" de los leucocitos en la respuesta inflamatoria.

Las selectinas se expresan en la superficie de los leucocitos (L-selectina), de las plaquetas (P-selectina) y de las células endoteliales (E-selectina). Las citocinas inflamatorias, principalmente el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la IL-1, activan las selectinas, aumentando su expresión en la superficie celular. Este proceso es esencial en la fase inicial de la respuesta inflamatoria, interviniendo en el reclutamiento e interacción de las CE con los leucocitos. La siguiente etapa de la migración de los leucocitos, está mediada predominantemente por las integrinas (LAF-1, CAM-1, VLA-4), el receptor para la glucoproteína (GPIIb/IIIa), la VCAM-1, las moléculas de adhesión intercelular 1 y 2 (ICAM-1 e ICAM-2), las citocinas inflamatorias (IL-1, IL-4, IL-8), el TNF- α , el interferón y (INF-y) y las guimiocinas.

Conjuntamente a la expresión de las CAMs en las CE, en los leucocitos y en las plaquetas, las inmunoglobulinas VCAM-1 e ICAM-1 se expresan también en las VSMC^{76,77}. Desde el punto de vista inmunológico, la adherencia de los monocitos a la superficie endotelial de los vasos sanguíneos, representa uno de los estadios más tempranos en la formación de la lesión aterosclerótica. En la fase inicial de la enfermedad aterosclerótica inducida experimentalmente con dieta aterogénica, los monocitos se adhieren a la superficie del endotelio vascular en zonas que posteriormente evolucionan hacia placas ateromatosas. La evolución de los monocitos (macrófagos), hacia las características células espumosas, sugiere que los macrófagos están expuestos a una carga abrumadora de lípidos y detritos celulares que alteraran su función ateroprotectora. Por consiguiente, se presume que la interrupción del ingreso de los monocitos al interior de la pared de los vasos sanguíneos, evitaría la progresión de las lesiones ateroscleróticas.

3.4 Monocitos (macrófagos) y aterosclerosis

Los granulocitos excepcionalmente hacen parte del proceso aterogénico. Por el contrario, los monocitos (derivados de los macrófagos) y algunos subtipos específicos de

linfocitos T, participan activamente en los diferentes estadios de la enfermedad aterosclerótica⁴⁴. La respuesta inflamatoria y fibroproliferativa crónica confiere a los monocitos y a los linfocitos T el protagonismo en la génesis y progresión de las lesiones ateromatosas. Los linfocitos T producen TNF-α e INF-γ, activando los monocitos y el factor estimulante de la formación de colonias de los granulocitos-macrófagos (GM-CSF), incrementando la proliferación de los macrófagos. La mayor afinidad de los monocitos hacia el endotelio disfuncionante parece obedecer a la expresión endotelial de las CAMs, promovidas por diversos agentes proaterogénicos como las citocinas o las LDLox. La interacción entre los monocitos y el endotelio vascular se establece a través de las selectinas. La disfunción del endotelio aumenta la expresión de VCAM-1 e ICAM-1, favoreciendo el contacto entre los monocitos y la pared de los vasos sanguíneos mediante ciertos receptores concretos. Posteriormente los monocitos cruzan el endotelio vascular a través de los espacios intercelulares con la participación de otras proteínas especializadas, como la molécula de adhesión plaquetaria 1 (PECAM-1).

Una vez en la íntima, los monocitos se transforman en macrófagos, incrementando la expresión de los receptores *scavenger* (basurero), permitiendo fagocitar los lípidos modificados durante el proceso oxidativo. Los receptores *scavenger* son proteínas que forman parte de la estructura de la membrana celular y captan gran variedad de moléculas, incluyendo las LDL modificadas (LDLm) y las LDLox. Los ésteres de colesterol se acumulan en el citoplasma de estas células y los macrófagos se convierten en células espumosas, las cuales son en realidad macrófagos con elevado contenido lipídico. Las LDLm, los linfocitos T, las CE y las VSMC, promueven la transformación de los monocitos a macrófagos en la capa íntima de la pared arterial. Los macrófagos a su vez actúan como células presentadoras de antígenos. Por consiguiente, los macrófagos representan los principales mediadores de la respuesta inflamatoria en el microentorno de la lesión aterosclerótica. La activación de los monocitos, aumenta la producción de anión

superóxido a través del complejo enzimático de la NADPH oxidasa. El anión superóxido altera las CE y la expresión génica. Adicionalmente, el anión superóxido generado por los monocitos, contribuye al incremento del estrés oxidativo, ya que participa en el proceso de oxidación de las LDL, alterando funciones celulares básicas como la adhesividad y la proliferación celular⁷⁸.

3.5 Transmigración endotelial, monocitos y el factor de transcripción NF-kB

La activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-kB) es decisivo en el proceso inflamatorio vinculado a la ATS. La transmigración endotelial de los monocitos (macrófagos) al interior de la pared de los vasos sanguíneos, aumenta la presencia de estas células en la intima. En la intima, los monocitos se exponen a diversos factores como las LDLox, lo que determinará su función y diferenciación como macrófagos, activando la cascada inflamatoria. Las LDLox además de promover la diferenciación de los monocitos en macrófagos, activan diversas sustancias en los macrófagos como el NF-kB⁷⁹. Adicionalmente al estrés oxidativo, otros factores proinflamatorios como las citocinas, los factores de crecimiento y diversos agentes microbianos, activan el NF-kB. A más de de los macrófagos y de las CE, se ha identificado actividad del NF-kB en las VSMC de los vasos ateroscleróticos, en las que su presencia está en relación con la severidad de la EC. Entre los numerosos agentes regulados por el NF-kB se cuentan también varias citocinas como el TNF-α, la IL-1, la IL-6, la IL-8, el GM-CSF, la MCP-1, el factor tisular y diferentes CAMs, como la VCAM-1 y la selectina E⁸⁰.

3.6 Células espumosas, captación de las LDLm y el proceso aterogénico

La interacción entre las LDL y los proteoglicanos en la íntima de la pared arterial favorece la modificación y agregación de las LDL. Las LDLm (oxidadas, acetiladas, glucosiladas e incorporadas a otras moléculas o complejos autoinmunes), aumentan la captación de los monocitos en la lesión aterosclerótica, favoreciendo la respuesta inflamatoria. La captación de las LDLm por parte de los macrófagos, representa uno de los

poseen receptores para las LDL nativas (LDLR) y captan gran cantidad de partículas de

LDL, transformándosen posteriormente en las mencionadas células espumosas.

Cuando las LDL guedan atrapadas en el espesor de la pared arterial presentan un proceso de oxidación progresivo^{70,71}. Durante la oxidación de las LDL, los ácidos grasos sufren un proceso de peroxidación, generando aldehídos de cadena corta y cetonas, las cuales se unen mediante enlaces covalentes a las apo-B de las LDL. De esta forma, se facilita su integración al receptor scavenger y la fagocitosis por parte de los macrófagos. Una vez que las LDLm se adhieren al receptor scavenger, inician una serie de cometidos en el interior de las células del vaso sanguíneo. Estas actividades incluyen la liberación de citocinas inflamatorias (perpetuando la respuesta inflamatoria) y la oxidación de las LDL, generando mayor actividad inflamatoria en la pared de la arteria. La permanencia de las LDLox en la MEC a nivel de la capa íntima de la arteria, magnifica el proceso inflamatorio. Las VSMC también captan LDLm a través de los LDLR, aumentando la expresión de los receptores scavenger en la membrana celular. Debido a que la concentración intracelular de colesterol no regula los mecanismos de captación de las LDL mediados por los receptores scavenger, se acumula gran cantidad de lípidos peroxidados y ésteres de colesterol en el interior de los macrófagos y de las VSMC, generando estas reconocidas células espumosas.

Se han reportado algunos estudios sobre la expresión de los receptores *scavenger* en las células espumosas de las placas ateromatosas. No obstante, se desconoce su función específica en la aterogénesis. Se cree que los LDLR constituyen un marcador de la formación de las células espumosas. Los LDLR se expresan en las VSMC, aunque la concentración intracelular de colesterol no regula su expresión. En las VSMC este mecanismo presenta gran avidez, aunque baja especificidad hacia la captación de las LDLm. Debido a que los LDLR se expresan en las lesiones ateroscleróticas, se presume

que la captación de las LDLm, por mediación de los LDLR, favorecen el almacenamiento de lípidos en las VSMC⁸¹.

3.7 Las células musculares lisas y la matriz extracelular de los vasos sanguíneos

Las VSMC representan el mayor componente celular en la fase inicial de las lesiones ateroscleróticas, alcanzando el 90% del contenido celular de estas lesiones. Por el contrario, en la ATS avanzada esta proporción es inferior al 1%, predominando la MEC sobre la masa de las VSMC. Las células presentes en las placas ateromatosas producen diversas moléculas que estimulan las VSMC, modificando su fenotipo. Las VSMC que presentan fenotipo contráctil no proliferativo evolucionan hacia células que proliferan activamente. Estas células migran merced al estímulo de agentes quimiotácticos, generando diversas proteínas en la MEC (colágeno, elastina y proteoglicanos). La transformación de las VSMC favorece la expresión de ciertos genes que regulan algunos factores como el PDGF y el IGF-1 (factor de crecimiento tipo insulina 1). Estas sustancias estimulan la producción de citocinas como la IL-1 y el factor de crecimiento transformante β (TGF-β), permitiendo a las VSMC modular su propia actividad y la de otras células implicadas en el proceso aterogénico. Cuando las VSMC alcanzan el umbral crítico de proliferación migran hacia la intima, en donde proliferan más activamente. Estas VSMC que proliferan ávidamente poseen gran capacidad para sintetizar proteoglicanos, los cuales interaccionan con las LDL, favoreciendo su agregación y captación por las mismas VSMC y los macrófagos.

En las placas ateromatosas susceptibles a la ruptura existen pocas VSMC pero abundan los macrófagos y los linfocitos T. Los linfocitos T producen factores como el TNF- α y la IL-1 β que activan las metaloproteinasas que degradan la MEC (tanto el colágeno como los proteoglicanos). Las metaloproteinasas son una familia de proteínas vitales para la conservación de la compleja MEC. Estas proteínas actúan como mensajeros en varias vías de señalización molecular^{44,82}. La complejidad de la MEC se explica mediante

acoplamiento (empalme) alternativo (*alternative* RNA *splicing*). El *splicing* alternativo permite que a partir de una secuencia genómica única (gen), se codifique la síntesis de diferentes proteínas. Este hecho deja sin fundamento, la antigua teoría: "un gen una proteína", añadiendo complejidad a los mecanismos de regulación de la expresión génica. Se han identificado múltiples genes que controlan su funcionamiento^{83,84}.

Diversos factores mitogénicos endoteliales producidos por los macrófagos, como el factor de crecimiento de los fibroblastos β (FGF- β), el PDGF, el VEGF y la trombina, regulan la migración de las VSMC e incrementan la expresión de proteasas (plasmina y metaloproteinasas) que degradan la MEC. En las lesiones ateroscleróticas, el aumento de la actividad de estas enzimas, favorece la migración de las VSMC. De otra parte, el balance local entre el activador del plasminógeno tisular (t-PA) y su inhibidor (PAI-1), repercute en el desplazamiento de las VSMC, en la síntesis y degradación de la MEC y por ende, en la evolución de las lesiones ateroscleróticas. El PDGF es primordial para la proliferación de las VSMC en la íntima de los vasos sanguíneos. La lesión del endotelio vascular estimula la interacción entre las plaquetas y la pared de los vasos sanguíneos, además de aumentar la producción del PDGF y neutralizar la acción fisiológica inhibitoria que ejerce el NO' sobre la proliferación de las VSMC. A más del PDGF, la trombina, la angiotensina II y el TGF- β (producido por los monocitos/macrófagos en las placas de ateroma), promueven la proliferación de las VSMC e incrementan el espesor de la MEC^{44,82}.

4. Biología molecular de las HDL

La principal proteína de las HDL está representada por la apolipoproteína AI (apoA-I). Esta proteína se sintetiza en el hígado y en el intestino, secretándose posteriormente al torrente sanguíneo. La apoA-I regula el destino final de las HDL, por lo que en condiciones fisiológicas su concentración plasmática se correlaciona estrechamente con los niveles de

HDL. La apolipoproteína AII (apoA-II) es la segunda apolipoproteína más abundante de las HDL, si bien poco se sabe acerca de sus funciones. Diversos estudios en modelos murinos avalan la importancia de la apoA-I en la biología de las HDL. La delección del gen de la apoA-I disminuye las HDL favoreciendo la aterogénesis. De otro lado, la expresión hepática de la apoA-I aumenta las HDL y protege contra la ATS⁵².

Las HDL carecen de apolipoproteína B (apoB), lo que les permite atravesar bidireccionalmente el endotelio vascular. Por el contrario, las LDL adolecen de esta particularidad, permaneciendo atrapadas entre los proteoglicanos del subendotelio^{70,85}. La apoB confiere carga positiva a las LDL, condicionando su permanencia entre las cadenas de los glucosaminoglicanos (partículas que conforman la matriz de los proteoglicanos), los cuales poseen carga negativa⁸⁵. No obstante, Navab y cols.⁷⁰, descubrieron que las LDL también pueden salir del espacio subendotelial, siempre y cuando las LDL no hubiesen alcanzado un umbral crítico de oxidación que las obligue a permanecer "atrapadas" indefinidamente.

El principal factor que determina la concentración de las HDL, es el aclaramiento de la apoA-I y no su tasa de síntesis. Los riñones, el hígado y los tejidos que poseen capacidad para producir esteroides, son los órganos responsables del catabolismo de las HDL. Este proceso se realiza mediante endocitosis y degradación lisosómica de la holopartícula de HDL (incluida la apoA-I). También se lleva a término dicho proceso mediante la "captura" de colesterol y de los demás lípidos adheridos a las partículas de HDL, conservando la estructura de la lipoproteína. En este aspecto, el mecanismo mejor caracterizado es la captación selectiva del colesterol por medio del receptor *scavenger* hepático clase B tipo 1 (SCAR-B1)⁵².

La renovación de las HDL (más que su concentración), es lo que probablemente reviste mayor trascendencia en la protección vascular. La acción de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) en las HDL, facilita la esterificación por

mediación de la LCAT (lecitina colesterol aciltransferasa o transferasa de grupos acilo desde lecitina a colesterol) y por consiguiente, el eflujo de colesterol. A su vez, la acción combinada de la CETP y de la lipasa hepática sobre las HDL maduras (HDL con abundante contenido de lípidos y escaso contenido protéico) generan fracciones de HDL con bajo contenido de lípidos que son mejores aceptoras de colesterol⁷².

4.1 Transporte inverso del colesterol

Las HDL constituyen un mediador del fenómeno inflamatorio en el interior del ateroma, merced a su mecanismo de acción involucrado en el transporte inverso del colesterol (TRC). El TRC desempeña una función ateroprotectora al extraer las lipoproteínas aterogénicas del interior de la pared arterial limitando la perpetuación del estímulo inflamatorio. El depósito de lípidos en la pared arterial es un proceso dinámico y bidireccional, en el que concurren mecanismos específicos involucrados en la extracción del colesterol que se acumula en la pared de los vasos sanguíneos⁵².

Existen varios mecanismos a través de los cuales las HDL ejercen efectos antiaterogénicos, siendo el más importante de ellos el TRC. El TRC es un mecanismo complejo mediante el cual las HDL captan el exceso de colesterol procedente de los tejidos extrahepáticos que tras ser esterificado por acción de la LCAT, se transporta selectivamente al hígado para su ulterior metabolismo y excreción por la bilis. Las HDL cumplen una función primordial en el TRC. Existen receptores indispensables en el TRC localizados en diferentes tejidos. Entre estos, el receptor ABCA-1 (ATP binding cassette transporter A-1) de los macrófagos y el receptor SCAR-B1 de los hepatocitos, son imprescindibles. En el hígado, el receptor SCAR-B1 media la captación hepática selectiva de las HDL y su excreción biliar, a diferencia de algunas proteínas de las HDL como la apoA-I que no las capta. El receptor SCAR-B1 se expresa en el hígado y en los macrófagos, favoreciendo el flujo de colesterol hacia las HDL. La contribución del transporte bidireccional de las HDL en el macrófago durante el TRC y el proceso

aterosclerótico, solo se conoce parcialmente^{44,52}. La necesidad fisiológica del TRC obedece a que el colesterol que captan las células por medio de las lipoproteínas (o el que sintetizan *de novo*) es tóxico para la propia célula si no se esterifica.

El proceso de captación de colesterol a través de las HDL de reciente formación (HDL con escaso contenido lipídico) se realiza por varios mecanismos, entre los que se incluye:

1. El receptor ABCA-1 (a través de las apoA-1 de reciente formación). 2. El receptor SCAR-B1, mediante aceptores que poseen HDL y apolipoproteínas que contienen lípidos.

3. Los receptores ABCG-1/ABCG-4 (highly homologous members of the ATP binding cassette ABC transporter family) que regulan la homeostasia celular de colesterol. El receptor ABCG-1 también constituye una ruta alterna al transporte del colesterol libre desde los macrófagos hacia las HDL que contienen lípidos, pero no hacia las HDL de reciente formación.

Las HDL de reciente formación "sufren" un proceso de remodelado y "maduración" intravascular mediante la acción de diversas enzimas como la LCAT, la CETP, la proteína de transferencia de fosfolípidos y de diferentes lipasas (lipoproteinlipasa, lipasa hepática y lipasa endotelial). El ciclo del TRC se completa mediante la captación de ésteres de colesterol por el hígado a través de los receptores hepáticos de las LDL. La importancia de la CETP radica en su capacidad para depletar ésteres de colesterol y enriquecer las HDL en triglicéridos, reduciendo su tamaño⁵².

La importancia antiaterogénica de las HDL también deriva de su actividad antioxidante directa e indirecta, ya que las HDL captan ésteres de colesterol peroxidados (CEOOH) desde las LDL, siendo eliminados posteriormente como hidróxidos de ésteres de colesterol (CEOH) mediante el TRC. Pese a ello, existe contradicción en la literatura respecto al protagonismo del transporte de los CEOOH por parte de las HDL *versus* las LDL⁷².

4.2 Funciones de las HDL independientes del transporte inverso del colesterol

Las HDL al mismo tiempo que desempeñan su cometido en la regresión de la placa de ateroma a través del TRC limitan la progresión de la lesión ateromatosa. Esto obedece a que las LDL disminuyen selectivamente la producción de las CAMs, ya que estas moléculas favorecen la permanencia de las células inflamatorias en la pared de los vasos sanquíneos. Las HDL ejercen otras acciones antiaterogénicas a razón de sus propiedades antioxidantes: 1. Interfieren con los efectos proinflamatorios de las LDLox, reduciendo de este modo la expresión de las CAMs promovidas por las citocinas. 2. Impiden la formación de las LDLmox⁷⁰. 3. Inhiben la actividad de las LDLox y evitan que las células de la pared arterial transfieran radicales libres y ROS a las LDL que permanecen retenidas en la intima de las arterias. 4. Inactivan los fosfolípidos oxidados proinflamatorios formados a partir de las LDLox, interrumpiendo la oxidación de las LDL a diferentes niveles. 5. Disminuyen el reclutamiento de los monocitos y la expresión de las metaloproteinasas de la MEC en el interior de la pared arterial⁸⁶. 6. Inhiben la actividad del TNF-α (un mediador de la apoptosis celular), en el centro necrótico del ateroma inestable. 7. Restablecen la función endotelial, al incrementar la expresión de la eNOS a través de su receptor para las HDL, aumentando la biodisponibilidad de NO^{*87}. Todas estas acciones reducen el riesgo de trombosis y la probabilidad de ruptura de la placa ateromatosa⁵².

El hallazgo y caracterización del receptor SCAR-B1 para las HDL y del transportador del colesterol ABCA-1, ha contribuido a comprender los mecanismos moleculares implicados en la protección contra la ATS. Del mismo modo, diferentes enzimas vinculadas a la actividad antioxidante de las HDL como las fosfolipasas o las paraoxonasas (PON), las cuales poseen gran capacidad para hidrolizar lípidos proinflamatorios en la placa aterosclerótica⁸⁸⁻⁹², han sido imprescindibles en este aspecto.

4.3 Enzimas antioxidantes vinculadas a las HDL

Las propiedades antioxidantes de las HDL no son exclusivas de las enzimas PON. La acetilhidrolasa del factor activador de las plaquetas (PAF-AH) es una de las enzimas más importantes de las HDL. La PAF-AH inhibe el factor activador de las plaquetas (PAF). La PAF-AH constituye la única fosfolipasa A2 de las HDL, ya que la PON1 carece de actividad fosfolipasa sobre el PAF y sobre los fosfolípidos oxidados⁹³. Pese a ello, existen evidencias que sugieren que la PON1 debe estar presente para justificar las propiedades antioxidantes y antiaterogénicas de las HDL⁹⁴. Se sospecha que ambas enzimas ejercen su acción conjuntamente *in vivo*, ya que estas enzimas difieren en su afinidad hacia los fosfolípidos oxidados, en función de la longitud de la cadena del ácido graso esterificado en la posición sn-2^{72,94}.

La presunción de la existencia de la actividad conjunta PON-HDL surgió al menos en parte, como una respuesta a la relación inversa existente entre la concentración de HDL y la presencia de EC en diferentes estudios poblacionales⁹⁵. De esta forma, su actividad antioxidante justificaría el papel protector incluso en el TRC. La esterificación del exceso de colesterol se realizaría en las HDL mediada por la acción de la LCAT, la cual es particularmente sensible a los CEOOH. La actividad PON1 dirigida a la eliminación de fosfolípidos peroxidados y de CEOOH y su posterior eliminación a través del TRC, contribuirían sinérgicamente a la reducción del riesgo cardiovascular⁷². Se han descrito mecanismos moleculares adicionales que median la protección vascular en la interacción HDL-PON^{72,96}.

A la función ateroprotectora vinculada al TRC, a de aunarse el efecto antioxidante de las diferentes enzimas asociadas a las HDL. La identificación de múltiples sustratos de la actividad PON amplía el horizonte de la protección vascular mediada por las HDL. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la interrelación HDL-PON y de

5. Óxido nítrico y aterosclerosis

A mediados de la década de los 80, el factor relajante derivado del endotelio (EDRF) fue identificado como el NO*, implicando su importancia en el sistema cardiovascular y en todos los sistemas biológicos^{97,98}. La revolucionaria trascendencia de estos hallazgos, motivó a la revista *Science* a elegir el NO* como la molécula del año en 1992 (Figura 16). En 1998, se concedió el premio Nobel de Medicina y Fisiología a los investigadores estadounidenses: Ferid Murad, Robert Furchgott y Louis Ignarro, por sus trabajos en el estudio y descubrimiento del NO*.

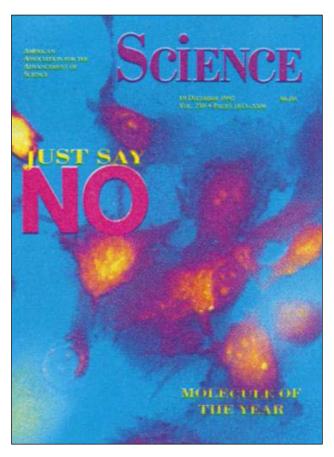


Figura 16. Óxido Nítrico. Imagen de la portada de la revista Science, publicada el 18 de diciembre de 1992. *Koshland Jr DE. The molecule of the year. 1992;258(5090):1861.*

5.1 El óxido nítrico como mensajero intercelular

El estudio del NO¹ ha sido el campo de mayor expansión en el conocimiento biológico en las dos últimas décadas. Su trascendencia radica en ser la primera sustancia química gaseosa que se ha demostrado que producen las células para emitir señales intercelulares (mediador biológico)⁹⁷. El NO¹ es una sustancia afín en sus acciones a los nitrovasodilatadores y es esencial para comprender los mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos de numerosos órganos y sistemas celulares⁹⁸. Aunque el NO¹ es una molécula vital para el funcionamiento del organismo, su producción no siempre es beneficiosa. El exceso o disminución de la producción de NO¹ puede traer nefastas consecuencias, como de hecho sucede en ciertos procesos patológicos⁹⁹. Esto obedece a que el NO¹ actúa directamente sobre la respiración mitocondrial o a través de sus metabolitos (como el peroxinitrito), favoreciendo la muerte de las células. Un mecanismo inespecífico de defensa contra el huésped⁹⁸.

En 1989, poco tiempo después de que el NO fue identificado ⁹⁷, Ochoa JB y cols. (Figura 17), evaluaron la hipótesis que contrastaba el aumento del NO y la inestabilidad hemodinámica de los pacientes con sepsis. Dos años después, estos investigadores reportaron las primeras observaciones en humanos que relacionaban el exceso en la producción del oxido nítrico y la fisiopatología de la sepsis.

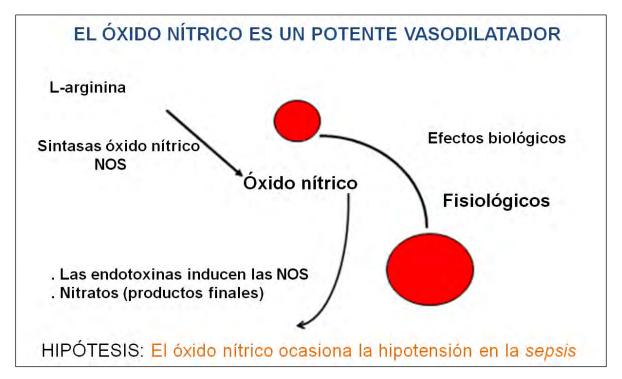


Figura 17. Óxido nítrico y sepsis. En 1991, Ochoa JB y cols.(1), reportaron las primeras observaciones en humanos que relacionaron el incremento del oxido nítrico y la inestabilidad hemodinámica de los pacientes sépticos. Figura adaptada de: Ochoa JB. A Rational Approach Towards Immunonutrition in Surgical and Critical Illness. University of Kentucky General Surgery Grand Rounds lectures 2011. Nestlé Health Science. Nestlé Health Care Nutrition, Inc. Copyright 2011. http://surgery.med.uky.edu/surgery/education/grand_rounds/2011. (1) Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, Peitzman AB. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. Ann Surg. 1991 Nov;214(5):621-6.

Más recientemente, el descubrimiento de Ochoa y cols. (Figura 18), de que las células mieloides (MC) bajo ciertos estímulos expresan argininasa 1 (MDSC/Myeloid Derived Suppressor Cells), destruyendo la arginina y suprimendo las funciones biológicas arginino dependientes (producción de óxido nítrico, función de los linfocitos T, cicatrización de las heridas), ha tenido trascendentales implicaciones clínicas en el entendimiento y abordaje de la disfunción inmune en diferentes enfermedades (cáncer, infecciones crónicas), además de otros escenarios como la cirugía y el trauma.

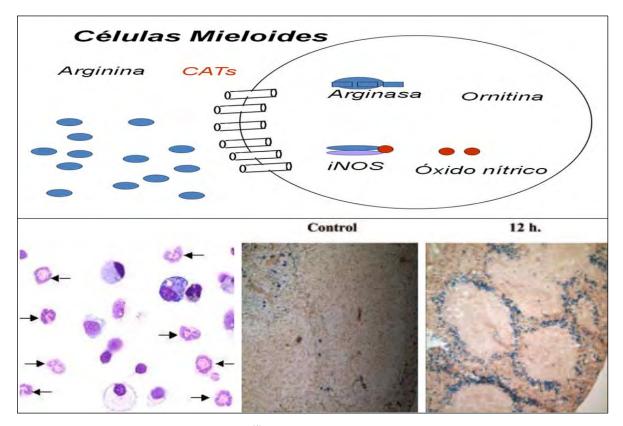


Figura 18. Células mieloides y arginina⁽¹⁾. El incremento del óxido nítrico (NO⁻) en pacientes sépticos descrito por Ochoa JB y cols.⁽²⁾ (Figura 17) no se encontraba inicialmete en víctimas de traumatismo y sepsis secundaria, en los que el NO incluso disminuía, circunstancias estas sin clara explicación inicial. Margen superior. La disponibilidad de un modelo murino ideado por Ochoa y cols. permitió comprender el metabolismo de la arginina en las células mieloides (MC) posterior al trauma. CATs (transportadores de aminoácidos catiónicos). Figura adaptada de: Ochoa JB. A Rational Approach Towards Immunonutrition in Surgical and Critical Illness. University of Kentucky General Surgery Grand Rounds lectures 2011. Nestlé Health Care Nutrition, Inc. 2011. http://surgery.med.uky.edu/surgery/education/grand_rounds/2011. Margen inferior. Izquierda. Las MC que producen argininasa 1 (MDSC/Myeloid Derived Suppressor Cells) muestran lobulaciones en sus núcleos conformando anillos. Figura adaptada de: Ochoa JB. Improving Outcomes in Surgery, Trauma and Critical Illness: One Bite at a Time, Nestlé Health Care Nutrition, Inc. 2011. http://www.scoap.org/downloads/1107 Nutrition Ochoa.pdf. Derecha y centro. Las MDSC (matiz azul) invaden el bazo en las primeras 12 horas después del trauma, causando disfunción de las células T a través de un mecanismo mediado por la argininasa 1 (depleción de arginina). En condiciones basales (control) se observan pocas MDSC. Figuras adaptadas de: Makarenkova VP, Bansal V, Matta BM, Pérez AL, Ochoa JB. CD11b_/Gr-1_ Myeloid Suppressor Cells Cause T Cell Dysfunction after Traumatic Stress. The Journal of Immunology. 2006;176:2085-2094. (1) Nestle Nutr Inst Workshop Ser. 2013;77:29-45. Ochoa J.B. Arginine Deficiency Caused by Myeloid Cells: Importance, Identification and Treatment. In: Makrides M, Ochoa JB, Szajewska H (eds): The Importance of Immunonutrition. Nestlé Nutr Inst Workshop Ser. Nestec Ltd. Vevey/S. Karger AG Basel, © 2013. (2) Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, Peitzman AB. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. Ann Surg. 1991 Nov;214(5):621-6.

Las MC constituyen una compleja línea celular que incluye los granulocitos y los macrófagos. El metabolismo de la arginina es mínimo en las MC en ausencia de actividad del sistema inmunológico. La activación del sistema inmune durante la enfermedad hace que se utilice la arginina por dos vías diferentes, con consecuencias biológicas y

metabólicas disímiles: 1. Respuesta inflamatoria clásica de las MC (M1) que estimula la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), produciendo grandes cantidades de NO (observada en el curso de las infecciones agudas), esencial en la defensa contra los microorganismos y las células cancerosas. 2. Respuesta alternativa de activación de los macrófagos (M2) que estimula la argininasa 1, desdoblando la arginina en ornitina y urea. El Síndrome de la Deficiencia de Arginina (*Arginine Deficiency Syndrome*) postulado por estos autores (Figura 18), representa la primera descripción del déficit de un aminoácido (arginina), como consecuencia de la destrucción de un nutriente por el sistema inmunológico.

5.2 Óxido nítrico y función endotelial

El NO representa en esencia una molécula gaseosa generada por distintas células del endotelio vascular (entre ellas los neutrófilos), siendo el NO un vasodilatador endógeno vital y una molécula ateroprotectora por excelencia. En condiciones fisiológicas, el NO endotelial se sintetiza en el endotelio vascular por intermedio de la eNOS (Figura 19).



Figura 19. Óxido nítrico endotelial. El óxido nítrico (NO') endotelial se sintetiza en el endotelio vascular por intermedio de la sintasa endotelial del oxido nítrico (eNOS). La dimetilarginina asimétrica (ADMA) inhibe la eNOS, disminuyendo la biodisponibilidad de NO' con la consiguiente alteración del endotelio vascular. O (oxígeno).

El NO de origen endotelial posee gran variedad de acciones fisiológicas encaminadas a conservar la función del endotelio vascular, su integridad y el entorno

antitrombótico. Por consiguiente, la disminución de la biodisponibilidad de NO constituye un mecanismo primordial en la génesis de la enfermedad aterosclerótica (Tabla 1).

Tabla 1. Efectos biológicos del óxido nítrico 99

Efectos ateroprotectores

Función vasodilatadora al difundirse a las células musculares lisas de los vasos sanguíneos (VSMC)

Neutraliza la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) liberadas durante el metabolismo celular

Regula la angiogénesis, la proliferación y migración de las VSMC

Regula el tono vascular

Regula la permeabilidad del endotelio vascular

Regula la interacción entre los leucocitos y el endotelio vascular

Disminuye la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)

Incrementa el GMP cíclico (GMP_c) en las plaquetas, disminuyendo la adhesividad y la agregabilidad plaquetaria

Consecuencias derivadas de la disminución la biodisponibilidad del óxido nítrico

Alteración de la homeostasia vascular

Pérdida de la protección de la pared vascular

Incremento de la permeabilidad vascular

Favorece el daño del endotelio vascular

Facilita la migración de los leucocitos y la respuesta inflamatoria

Aumenta la proliferación de las VSMC

Incrementa la agregación plaquetaria

Favorece el espasmo vascular a través de la síntesis de la endotelina-1, los tromboxanos y la serotonina

Favorece diferentes procesos: hipercolesterolemia, DM, HTA, IC, ATS, envejecimiento

Impide la adecuada cicatrización de las heridas

GMP_c (guanosín monofosfato cíclico); DM (diabetes mellitus); HTA (hipertensión arterial); IC (insuficiencia cardiaca); ATS (aterosclerosis).

5.3 Sintasas del óxido nítrico

Se conocen al menos 3 isoenzimas de las NOS: la NOS inducible (iNOS o NOS-II), la NOS neuronal (nNOS o NOS-I) y la eNOS (NOS-III). A su vez, las NOS presentan dos tipos funcionales diferentes. Un primer grupo representado por las NOS de clase constitutiva (la eNOS y la nNOS). El segundo prototipo denominado NOS inducibles (i), está representado por la iNOS⁹⁹.

Las NOS se expresan en diferentes líneas celulares por mediación de una familia de genes localizados en diferentes cromosomas: 1. El gen que expresa la iNOS se localiza en el cromosoma 17 (17cen-q11.2)¹⁰⁰. 2. El gen que expresa la nNOS se encuentra en el cromosoma 12 (12q24.2). 3. El gen eNOS que codifica la eNOS, se identificó en el cromosoma 7q35-36¹⁰¹.

En ausencia de inflamación, las NOS que se expresan constitutivamente (eNOS y nNOS) producen la mayor cantidad del NO' del organismo. Tanto la eNOS, como la nNOS, son enzimas calcio dependientes y producen NO' en baja concentración con fines fisiológicos 102-104. Por el contrario, la iNOS produce NO' durante tanto tiempo como la enzima permanezca activa. La iNOS se expresa a través de las células, una vez que las citocinas y otros mediadores de la inflamación inician la respuesta inflamatoria. La iNOS a diferencia de la nNOS y de la eNOS, no es calcio dependiente. Cuando la iNOS produce grandes cantidades de NO' genera toxicidad a las células.

5.4 Gen eNOS, óxido nítrico y enfermedades cardiovasculares

La función que desempeña el gen eNOS en las ECV ha sido estudiada tanto en animales de experimentación como en humanos. En los seres humanos, la investigación del gen eNOs ha sido dirigida básicamente hacia el estudio su expresión y de la respuesta inducida por el aporte de donantes de NO¹. En los trabajos experimentales se han empleado ratones transgénicos *knockout* (KO) para el gen eNOS (eNOS-/-) e inhibidores de las NOS: *NG-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME) y *NG-methyl-L-arginine* L-NMA)⁹⁹.

6. Factores de riesgo cardiovascular

En la actualidad definimos un FR como un elemento, o una característica mesurable que tiene relación causal con el aumento de la frecuencia de una enfermedad y que constituye a su vez un factor predictivo independiente y significativo del riesgo de presentar la enfermedad de interés^{39,105}. Convencionalmente se han considerado como principales FRECV: el consumo de tabaco, la HTA, la elevación de la glicemia, la DLP, la obesidad y la inactividad física¹⁰⁶. Sin embargo, se han propuesto nuevos FRECV, a los que se ha denominado FR emergentes del riesgo cardiovascular¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Se presume que los FR emergentes no alteran la concentración de las LDL, pero se asocian al desarrollo de las ECV. Uno de estos FR emergentes lo constituye la Hcy, un aminoácido

potencialmente tóxico¹⁰⁹, al que se le viene atribuyendo especial relevancia en Salud Pública¹¹⁰. Del mismo modo, se viene subrayando la importancia de otros FRECV, como la contaminación ambiental, entre otros FR¹¹¹.

El EHHC³⁵ en su artículo 4º (II Parte), reclasificó los FRECV en tres categorías: 1. Factores biológicos. 2. Determinantes del estilo de vida. 3. Amplios determinantes del riesgo cardiovascular, los que a su vez diferenció en FR modificables y FR no modificables (Tabla 2).

Tabla 2. Factores de riesgo cardiovascular³⁵

Factores biológicos

Incremento de la tensión arterial Incremento de la glucosa plasmática

Incremento del colesterol plasmático

Sobrepeso

Determinantes del estilo de vida

Tabaquismo Dieta insalubre Abuso de alcohol

Inactividad física

Amplios determinantes del riesgo cardiovascular

- mpnoo astonimantoo asi noogo sanano asounia		
Factores de riesgo no modificables	Factores de riesgo modificables	
Edad	Educación	
Género	Condiciones de vida	
Etnia (raza)	Condiciones laborales	
Factores genéticos	Estrés psicosocial	
	Capacidad adquisitiva	

The European Heart Health Charter (EHHC). Disponible en http://www.heartcharter.eu/.

Aunque se ha difundido el concepto de que los cuatro FRECV tradicionales (tabaquismo, DM, HTA e hipercolesterolemia), explican exclusivamente el 50% del total de individuos que padecen EC, la exposición a los principales FRECV es sumamente frecuente (> 80%) en las personas que desarrollan EC y explican alrededor del 75% de la prevalencia de esta enfermedad¹¹².

La "Paradoja del sur de Europa", indica que los FRECV clásicos explican exclusivamente parte del riesgo cardiovascular, ya que no tienen en consideración la contribución de los factores protectores³⁹. El análisis de la cohorte del estudio VERIFICA¹¹³ (Validez de la Ecuación de Riesgo Individual de Framingham de Incidentes Coronarios Adaptada), mostró que la única diferencia en el perfil lipídico de los individuos que

padecieron eventos cardiovasculares durante los cinco años de seguimiento de la cohorte, fue la disminución de los niveles plasmáticos de las HDL ^{39,113}. Pese a ello, recientemente se viene cuestionando el papel protector de las HDL en las ECV ateroscleróticas ¹¹⁴. No obstante, los expertos recomiendan no olvidar las evidencias de los estudios epidemiológicos y de intervención acerca de la relación inversa existente entre el riesgo cardiovascular y la concentración de las HDL. Igualmente, los autores sugieren permanecer expectantes a los resultados de los estudios que evalúan el alcance de los nuevos inhibidores de la CETP.

Los hallazgos del estudio INTERHEART¹¹⁵ (Global case-control study of risk factors for acute myocardial infarction), dejaron patente que el impacto sobre el IAM de nueve FRECV con nivel de evidencia científica contundente (tabaquismo, HTA, DM, nivel de apolipoproteínas, obesidad abdominal, hábitos dietéticos, actividad física, consumo de alcohol y los factores psicosociales), son factores universales (afines a toda la población del mundo), con independencia del género y del grupo regional o étnico. Los hallazgos de este estudio señalan que más del 90% del riesgo de padecer IAM es atribuible a estos nueve FRECV. Este estudio subraya además que el binomio DLP-tabaquismo predice las dos terceras partes del riesgo de presentar IAM y que a su vez los FRECV ejercen un efecto multiplicador del riesgo cardiovascular.

Se ha estimado que los factores genéticos explican ~40-55% de la susceptibilidad de la población (heredabilidad) a padecer EC¹¹⁶⁻¹¹⁸. La investigación de los FRECV no convencionales y de los determinantes genéticos que subyacen a la EC son críticos en la búsqueda de nuevos nexos con la enfermedad aterosclerótica^{105,107}. Adolecemos de estudios que involucren los aspectos psicosociales, los hábitos de vida y del comportamiento en las enfermedades crónicas no transmisibles como la ATS¹¹⁹. En esta dirección, el estudio PURE (*Prospective Urban Rural Epidemiology*)¹²⁰, actualmente en curso en varios países en transición epidemiológica, construye sobre la experiencia del

estudio INTERHEART¹¹⁵ el engranaje dirigido hacia el mejor entendimiento de las ECV. El estudio PURE constituye un análisis de seguimiento que evalúa el efecto de los factores macro y microeconómicos en el estilo de vida, a más de los FR dietéticos en la génesis de las ECV. Uno de los hallazgos preliminares más llamativos de este estudio hace alusión a la infrautilización de medicamentos de probada eficacia en la prevención secundaria de las ECV¹²¹.

7. Prevención y estimación del riesgo cardiovascular

La prevención primaria de las ECV se fundamenta en el control de los FR, elementos estos asociados a la incidencia y mortalidad de estas enfermedades^{39,115}. La estimación del riesgo cardiovascular representa la mejor herramienta para establecer prioridades en prevención primaria³⁹. La baja sensibilidad en la función de la estimación del riesgo cardiovascular evidenciada por el hecho de que la mayoría de los eventos cardiovasculares se presentan en las personas clasificadas en el grupo de riesgo intermedio refleja la escasa capacidad discriminatoria de los FRECV clásicos. Se han propuesto diversos marcadores y/o predictores de las ECV⁶⁵. Desde el punto de vista del cálculo del riesgo, la inclusión de nuevos marcadores en las funciones de riesgo es incierta. A pesar de ello, se insiste en la búsqueda de nuevas estrategias de cribado poblacional de la ATS para identificar el "paciente vulnerable".

Se prevé que la utilización conjunta de las funciones del riesgo cardiovascular de los nuevos marcadores biológicos y de las pruebas de imagen no invasivas optimicen la prevención primaria de las ECV. En este aspecto, la evaluación de la ATS subclínica mediante pruebas de imagen no invasivas, es la iniciativa que más fuerza ha venido ganando^{39,65}. Entre estas pruebas diagnósticas, se han propuesto diferentes modalidades, entre las que destacan: 1. La tomografía computarizada con emisión de electrones EBCT (electrom beam computed tomography), con la que se comenzó a evaluar el índice de

calcificación de las arterias coronarias (CAC). No obstante, ha sido el CT multidedector (TCMD) el que ha permitido evaluar de forma no invasiva tanto la luz como la pared de las arterias coronarias. De otro lado, la resonancia nuclear magnética (RM/RNM) facilita el estudio de las alteraciones funcionales de la perfusión del miocardio. 2. El scanning duplex (Doppler-duplex) para medir el grosor de las capas media e intima de la arteria carótida (GIMc); la dilatación mediada por flujo de la arteria braquial (FMD/DDD) y el índice tobillo/brazo (ITB) o índice de Yao. 3. La ergometría en tapiz rodante. 4. La oftalmoscopia como cribado de la ATS. Todas estas exploraciones propuestas han sido evaluadas en grandes estudios. Pese a que estas pruebas son capaces de ofrecer información pronostica adicional a la proporcionada por la estimación del riesgo convencional, la falta de estandarización de algunas de ellas, la dificultad en su realización y/o su alto coste, las hacen impracticables como medición sistemática de la ATS subclínica en el momento actual^{39,64}.

Hoy en día, el número de marcadores biológicos que pueden utilizarse de forma rutinaria y con valor pronóstico real son mínimos^{65,122}. Se ha dicho que para que los test genéticos basados en el DNA tengan valor clínico, deben proporcionar información adicional a la que suministran los diferentes algoritmos diseñados para el cálculo del riesgo elaborados a expensas de los FRECV³⁹. La inclusión de ciertos genotipos a partir de los genes candidatos pudiera incrementar el poder predictivo de estos algoritmos, aumentando la sensibilidad y la especificidad en la determinación del riesgo de padecer ECV. Aunque se han estudiado varios genes implicados en el desarrollo de las ECV, no se ha logrado determinar el conjunto de genes que establezca el genotipo de riesgo específico en estas enfermedades¹²³.

En el último lustro los GWAS^{25,124} han identificado nuevas variantes genéticas relacionadas con diferentes enfermedades complejas, entre ellas la EC. Algunas de estos polimorfismos se asocian con algunos FRECV, aunque otros polimorfismos son

independientes de estos FR. Se cree que estas variantes genéticas incrementen la capacidad predictiva del riesgo coronario o la reclasificación de los individuos en riesgo intermedio, al aportar información adicional a la ya incluida en las funciones de riesgo clásicas¹¹⁸.

Algunas publicaciones recientes refuerzan el papel de los factores genéticos en el desarrollo de la EC^{125,126}. Se han identificado dos variantes genéticas asociadas a la lipoproteína a (Lip-a) y el riesgo de padecer EC¹²⁵. Regieli y cols.¹²⁶, reportaron incremento significativo de la mortalidad por eventos coronarios, en un estudio longitudinal relacionado con el impacto de las HDL en la prevención secundaria de la EC en individuos portadores de dos polimorfismos del gen de la enzima PON1. También se ha descrito relación lineal entre el número de alelos de riesgo y la probabilidad de padecer EC, lo que permitiría cuantificar el riesgo genético¹¹⁸.

8. Factores de riesgo epigenéticos

En las últimas décadas se vienen identificando profundos cambios en la prevalencia de las enfermedades crónicas no transmisibles (obesidad, DM, ECV), lo que ha obligado a buscar nuevos vínculos que expliquen estos hallazgos¹²⁰. La prevalencia de los FRECV se viene arraigando entre los jóvenes, confluyendo hasta en la mitad de los casos, múltiples FR. Circunstancia esta que incrementa ~14.6 veces el riesgo cardiovascular en este subgrupo poblacional en la edad media de la vida^{127,128}.

Las ECV, la obesidad y la DM, son patologías influenciadas por la herencia poligénica¹²⁹. Asimismo, se han identificado algunos determinantes prenatales en la génesis de la obesidad infantil como: la DM, el tabaquismo materno y la desnutrición en el período inicial de la gestación¹³⁰. Diferentes estudios revelan, que aunque las manifestaciones de la ATS se hacen evidentes en los adultos, la ATS comienza a gestarse en la vida fetal^{131, 132} (Figura 20).

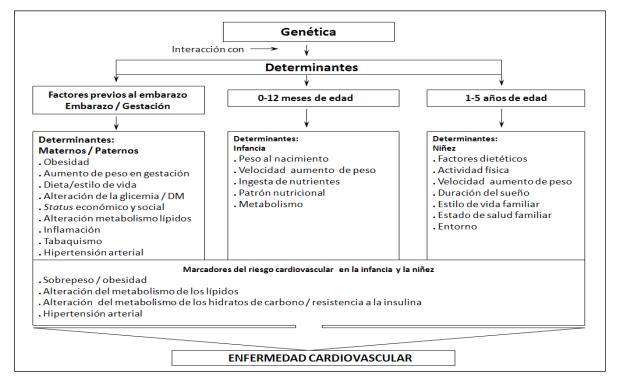


Figura 20. Marcadores del riesgo cardiovascular. La aterosclerosis comienza a gestarse antes de la concepción. Las influencias del entorno durante el desarrollo del organismo repercuten en la salud cardiovascular a lo largo de la vida de cada individuo. Adaptada de: *Morrison K*, *et al. Am Heart J.* 2009;158(4):535-539¹²⁹.

Existe evidencia creciente de que las interacciones entre los genes y el entorno (circunstancias estas inherentes a las enfermedades complejas) son reguladas al menos parcialmente por mecanismos epigenéticos. A diferencia de los conceptos clásicos de la herencia mendeliana, la epigenética hace énfasis en la heredabilidad de las alteraciones del DNA (diferentes a la variación en la secuencia de sus nucleótidos) promovidas por factores del entorno. Fenómeno este que ha sido denominado herencia epigenética¹³³ y del cual se deriva el compromiso hacia nuestros genes y hacia nuestra propia especie, además de la responsabilidad de nuestros progenitores y ancestros; un concepto ignorado por décadas.

¿Epigenetics? si, epigenética. A este respecto, Thomas Jenuwein afirmó: "The longstanding question of nature versus nurture begs the question: to what extent does genetic determination vis-a-vis environment driven signals affect the development and personal profiles of given individuals? Thanks to epigenetic research, we now know there are mechanisms beyond genetic determinism (there is no 'intelligent design') and that gives us the freedom to live as true individuals. This is best exemplified by genetically identical twins that can develop distinct disease profiles and life projections. Thus, 'we are more than the sum of our genes', and epigenetic research is likely to have significant impact on cultural and ethical values in our 'post-genomic' society' 134.

Las influencias del entorno en las etapas iniciales del desarrollo causan variaciones epigenéticas que afectan la programación del metabolismo celular influyendo en la salud cardiovascular a lo largo de la vida de cada individuo 135,136. Las complejas interacciones entre la genética, la epigenética y la exposición ambiental, aunadas al entorno infantil postnatal, constituyen el sustrato de la relación entre la salud de la madre, el crecimiento fetal, los FRECV en la infancia y las manifestaciones de la enfermedad en los adultos 129. Los FRECV alteran el funcionamiento del genoma mediante diversos mecanismos epigenéticos, promoviendo la aterogénesis 25.

Existen pocos estudios de cohorte que relacionen la influencia genética y el entorno familiar más allá del estado de la salud materna¹³⁷. Estos estudios aportan conclusiones contradictorias sobre la magnitud del efecto y la influencia de las variables de confusión, incluyendo los hábitos de los padres, el estado socioeconómico, el medio ambiente y la etnicidad en los resultados finales. El estudio FAMILY¹²⁹ (Family Atherosclerosis Monitoring In earLY life), pretende esclarecer algunos enigmas sobre los determinantes prenatales y de la infancia acerca de los FRECV en las fases críticas del desarrollo infantil. Se vislumbra que este estudio contribuya en positivo al diseño de programas de prevención más eficaces en aquellas nosologías, que como la ATS, se gestan en el entorno prenatal.

Los fenómenos epigenéticos son esenciales para el ordenamiento e interpretación del genoma, para el desarrollo y el proceso fisiológico del organismo, así como para

perfeccionar nuestro conocimiento de las enfermedades ^{138,139}. El conjunto de las enfermedades en los humanos presenta causas epigenéticas. En la célula enferma, a través de los diferentes mecanismos epigenéticos se distorsiona el equilibrio celular. En este aspecto, la caracterización de los diferentes epigenomas, la identificación de las variables epigenéticas, los estudios sobre las fuentes de variabilidad epigenética y los EWAS (estudios de asociación del epigenoma completo), aunados al perfeccionamiento bioinformático, prometen mejorar nuestro entendimiento de las enfermedades. No obstante, aún se requiere un cuantioso esfuerzo para determinar el perfil del epigenoma humano ¹³⁸⁻¹⁴⁰. La correlación de los patrones de metilación entre los diferentes tejidos es compleja y locus dependiente. Con todo ello, los rasgos epigenéticos presentes en las muestras clínicas convencionales (células sanguíneas), constituyen un material fácilmente asequible para su estudio ¹⁴¹.

Hoy disponemos de los instrumentos imprescindibles para revelar infinidad de enigmas de la biología humana y un universo de dilemas médicos. Recientemente y en esta línea de compromiso, la comunidad científica internacional en un esfuerzo coordinado, dio luz verde al esperanzado proyecto AHEAD (Alliance for the Human Epigenome and Disease), en su afán de perfeccionar el conocimiento de las enfermedades como el cáncer y las ECV, entre otras patologías^{57,58,134}.

La epigenética del sistema cardiovascular se encuentra aún en sus inicios. El desentrañamiento del epigenoma en la célula aterosclerótica, en el endotelio afectado por la formación de ateromas en el contexto de la EC y el estudio de los epigenomas de las diferentes líneas celulares que conforman la red de vasos sanguíneos del organismo, representan solo algunos de sus retos (Figura 21).

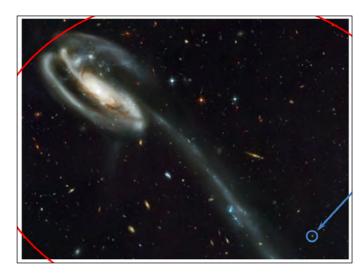


Figura 21. Conocimiento actual de la aterosclerosis. Metáfora aterosclerótica. Que sabemos y que deberíamos saber. Nuestro conocimiento actual sobre la aterosclerosis se simboliza en el interior del circulo azul (una mota solitaria), frente a lo que ignoramos (representado por la inmensa oscuridad cósmica, matizada entre las líneas del óvalo escarlata). Fotografía del Universo tomada por la NASA. *Tapoddle, VCG 10214. NASA and ACS Science Team. http://www.nasa.gov/tpoics/universo/index.html.*

A la espera de una nueva realidad, conviene tener siempre a mano aquel acreditado refrán del humanista holandés, Erasmo de Rotterdam (1466-1536): "Más vale prevenir que curar", ya que es imprescindible, tal y como lo han planteado las guías europeas de la práctica clínica de octubre de 2007 sobre la prevención de las enfermedades cardiovasculares⁶³: retomar las recomendaciones propuestas en la "Declaración de Luxemburgo" de junio de 2005³⁴ sobre el estilo de vida para alcanzar la salud cardiovascular, ya que son principios universales, están avalados por evidencias científicas contundentes y por consiguiente, deben indicarse en la prevención de las ECV de manera sistemática e independientemente del nivel del riesgo cardiovascular de cada individuo, porque: "prevenir sigue siendo mejor que curar"²⁹ (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. "Declaración de Luxemburgo" sobre el estilo de vida para alcanzar la salud cardiovascular 34

No fumar

Realizar ejercicio de intensidad al menos moderada, mínimo durante 30 minutos diarios

Al momento de alimentarse escoger alternativas saludables

Evitar el sobrepeso

Mantener la tensión arterial por debajo de 140/90 mm/hg

Mantener el colesterol total por debajo de 200 mgr/dL

Disponible en http://www.ptkardio.pl/files//file/luxembourgdeclarationfinal.pdf.

Tabla 4. Recomendaciones de las guías europeas de la práctica sobre la prevención de las enfermedades cardiovasculares 63

No fumar

Al momento de alimentarse escoger alternativas saludables

Realizar ejercicio de intensidad al menos moderada, mínimo durante 30 minutos diarios

Mantener el índice de masa corporal (IMC o BMI) por debajo de 25 kg/m² y evitar la obesidad central

Mantener la tensión arterial < 140/90 mm/hg

Mantener el colesterol total (CT) < 5 mmol/L (~190 mgr/dL)

Mantener las lipoproteínas de baja densidad (LDL) < 3 mmol/L (~115 mgr/dL)

Mantener la glucosa en sangre < 6 mmol/L (~110 mgr/dL)

Disponible en http://www.escardio.org/knowledge/guidelines/rules.

9. Homocisteína como factor de riesgo en la aterogénesis

Han transcurrido más de cuatro décadas desde que Kilmer McCully¹⁴² implicó la Hcy en la aterogénesis y han pasado ya más de 30 años desde que Wilcken y Wilcken¹⁴³, reportaron que los aminoácidos azufrados estaban relacionados con la EC. Entre los aminoácidos sulfurados, el incremento de Hcy está en relación con el riesgo cardiovascular de forma independiente a otros FR involucrados en la etiopatogenia de las ECV^{13,144}.

La Hcy altera el metabolismo oxidativo de las células al formar sustancias biológicamente reactivas¹⁵ y tóxicas a las células ejerciendo un efecto deletéreo en la pared de los vasos sanguíneos. La hiperhomocisteinemia (HHcy) ocasiona un fenotipo aterotrombótico por diversos mecanismos que incluyen: 1. Alteración de la estructura de las proteínas¹⁷. 2. Incremento del estrés oxidativo y de la respuesta inflamatoria^{15,145}. 3. Disfunción endotelial¹⁵. 4. Apoptosis¹⁴⁶. 5. Proliferación de las VSMC¹⁴⁷. 6. Trombogénesis¹⁴⁶. 7. La HHcy induce ATS al interferir con el metabolismo y el transporte de los lípidos a través de la vía del estrés oxidativo y/o del estrés del retículo endoplásmico (RE). 8. Adicionalmente, la HHcy disminuye la biodisponibilidad de NO¹ y modula la concentración de otros metabolitos como la SAM y la SAH, generando alteraciones neurológicas y cardiovasculares. El estrés del RE representa la vía común que relaciona la Hcy con la apoptosis y la ATS. La Hcy ejerce sus efectos al modular diversos procesos

catalíticos, además de regular la expresión de los genes involucrados en la génesis de las enfermedades complejas⁷³ (Figura 22). Se han descrito ampliamente las vías metabólicas a través de las cuales la Hcy causa daño a las células endoteliales¹⁴⁵⁻¹⁵². Los modelos experimentales de HHcy favorecen su nexo de causalidad con la ATB¹⁵². Adicionalmente, las vitaminas del complejo B reducen la concentración de Hcy^{14,153}.

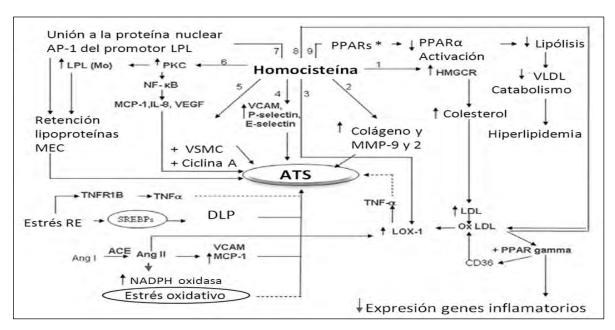


Figura 22. Homocisteína y aterosclerosis (ATS). La homocisteína (Hcy) altera la biosíntesis del colesterol (1); la expresión de las proteínas de la matriz extracelular (2); la expresión del gen LOX-1 (lectin like oxidized LDL receptor-1) y del factor de necrosis tumoral α (TNFα), promoviendo la oxidación de las LDL (3,8); altera las moléculas de adhesión celular CAMs (4); estimula la proliferación de las células del musculo liso vascular (VSMC) al incrementar la actividad de la ciclina A (5), aumentando la expresión de la LPL (lipoprotein lipase) tanto a nivel traslacional como transcripcional, mediante la activación de la PKC (proteína cinasa C), la cual regula los genes de la respuesta inflamatoria en las células del endotelio vascular (6,7). La Hcy además disminuye la expresión de los PPARs (peroxisome proliferators-activated receptors) (9). AP-1 (proteína activadora 1); Mo (monocitos); TNFR1B (tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B); SREBPs (sterol regulatory element-Binding Proteins); LOX1 (oxidized low-density lipoprotein receptor 1); PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors); *La Hcy compite con el ligando PPARs; PPARα (peroxisome proliferator-activated receptor alfa); HMGCR (hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa); VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad); MEC (matriz extracelular); NF-kB (factor de transcripción nuclear kappa B); MCP-1 (sustancia quimiotáctica plaquetaria 1); IL-8 (citocina/interleucina 8); VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular); VCAM (moléculas de adhesión de las células vasculares); P selectin (selectina P); E selectin (selectina E); LDL (lipoproteínas de baja densidad); LDLox (LDL oxidadas); DLP (dislipemia); Ang (angiotensina); ACE (enzima convertidora de angiotensina); NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate). Adaptada de: Sharma P, et al. Lipids Health Dis. 2006;5(1):1-1975

Pese a la idoneidad de las observaciones descritas existe incertidumbre sobre la fuerza de asociación entre la Hcy y la ATS como FR modificable, ya que la disminución de la Hcy versus el beneficio del riesgo cardiovascular esperado es a la luz actual

contradictorio¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Algunos autores han concluido que todavía no se ha validado la hipótesis que involucra la Hcy en la etiología de las ECV¹⁵⁶. Sin embargo, existen resultados contradictorios¹⁵⁷. Algunos ensayos clínicos controlados, reportan que la relación entre la Hcy y las ECV es más débil de lo esperado¹⁵⁸ (Figura 23).



Figura 23. Homocisteína y enfermedades cardiovasculares. Existe incertidumbre acerca de la correlación entre la homocisteína como factor de riesgo modificable y la génesis de las enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas.

A pesar del entusiasmo inicial de los resultados favorables de los estudios sobre el aporte de folatos en la dieta, el riesgo cardiovascular y la regresión de la placa aterosclerótica¹⁵⁹, estos beneficios no han sido confirmados en diversos estudios clínicos randomizados¹⁶⁰⁻¹⁶⁵. Una explicación propuesta a estos hallazgos alude que la Hcy *per se* quizás no sea el agente causal de la alteración vascular, sino más bien el marcador

biológico de otro FR coexistente¹⁶⁶. No obstante, se cree que la respuesta a estos hechos, se encuentra a nivel molecular¹⁵⁵.

En la historia natural de la HHcy de origen genético, las complicaciones vasculares constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes que no han recibido tratamiento¹⁶⁷. En 1969, McCully¹⁴² describió la presencia de lesiones arteriales avanzadas en niños con trastornos congénitos en el metabolismo de la Hcy, subrayando el nexo existente entre la enfermedad vascular y la HHcy severa de causa hereditaria. Desde entonces, se ha estudiado extensamente la Hcy como FRECV en diferentes revisiones sistemáticas^{146,168}, hallándose adecuadamente documentada la relación entre Hcy y ATB^{13,169}.

A diferencia de los estudios prospectivos, en los que se ha observado escasa relación entre la Hcy y las ECV, diferentes metaanálisis realizados en la última década han evidenciado resultados contundentes¹⁷⁰. La HHcy leve (un hallazgo prevalente en la población general) se relaciona con el riesgo cardiovascular¹⁷¹. Más del 10% de la población en riesgo de padecer EC presenta HHcy. El incremento de Hcy en 5μmol/L es equiparable al aumento de 20 mg/dL del colesterol plasmático frente al riesgo de padecer EC¹⁶⁸. El *Homocysteine Studies Collaboration*¹⁷⁰ (HSC) mostró que la disminución de 3μmol/L en la Hcy redujo el riesgo relativo de EC en 11% y de apoplejía en 19%. Wald y cols.¹⁷², reportaron que la reducción de Hcy en 3μmol/L redujo el riesgo de EC en 16%, de trombosis venosa profunda en 25% y de apoplejía en 24%. La HHcy predice el desarrollo de eventos cardiovasculares recurrentes (muerte de origen cardiaco, IAM o reinfarto) en pacientes con SCA^{173,174}, estando asimismo relacionada con el riesgo cardiovascular en la población general y en los pacientes con ATS establecida.

Aunque la evidencia acumulada favorece el vínculo entre Hcy y ATS, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares que involucran la Hcy como FR modificable en la aterogénesis. Los expertos afirman que esta relación de causalidad únicamente se podrá

9.1 Bioquímica de la homocisteína y de las reacciones de transmetilación celular

La Hcy es un aminoácido no protéico (ya que no participa en la síntesis protéica) que contiene azufre en forma de sulfuro^{175,176}, cuyo metabolismo se encuentra en la intersección de dos vías: la vía de la remetilación y la vía de la transulfuración celular¹¹⁰. La Hcy es a su vez un producto intermediario del metabolismo de la metionina (Met), ya que en los mamíferos la Hcy se sintetiza a partir de la Met^{175,176} (Figura 24).

Figura 24. Estructura química de los aminoácidos azufrados. Estructura molecular de los aminoácidos sulfurados (que contienen grupos sulfuro) fisiológicamente más relevantes. H (hidrógeno); C (carbono); O (oxígeno); S (azufre); CH₃ (grupo metil); SH (grupo sulfhidrilo/tiol o *thiol*). Adaptada de: *Masella R, et al. Glutathione and sulfur amino acids in human health and disease. 2009¹⁷⁶*.

La metilación del DNA (a través del ciclo de la Met) es crucial en la transmetilación celular^{16,25} debido a: 1. La participación en el control epigenético de la expresión génica. 2. La metilación postrasduccional de las proteínas.

El proceso de metilación celular comprende unas decenas de reacciones enzimáticas, las cuales utilizan SAM como donante de grupos metil. Por el contrario, las moléculas aceptoras de grupos metil son más numerosas y varían desde moléculas de pequeño tamaño (lípidos, aminoácidos), hasta macromoléculas como el DNA, las proteínas y el ácido ribonucléico (RNA). Mediante el aporte de los grupos metil se garantiza el aporte de carbono para la síntesis de las cuatro principales biomoléculas del organismo: ácidos nucléicos (DNA, RNA), aminoácidos (proteínas), carbohidratos y lípidos (derivados

lipídicos). La Hcy constituye un mediador biológico en las reacciones de transmetilación celular, incluyendo la metilación del DNA²⁵. En la vía de la transmetilación celular, la SAM se sintetiza a partir de la transferencia de la adenosina del ATP al grupo sulfhidrilo de la Met¹⁶. La producción de Hcy depende de la concentración de SAM, responsable a su vez de múltiples reacciones de metilación celular. La SAM se transforma en SAH (al transferir su grupo metil a un aceptor). La SAH se metaboliza hacia adenosina y Hcy mediante un proceso de hidrólisis.

En condiciones fisiológicas, la Hcy se regula primordialmente por medio de: 1. Su remetilación hacia Met, con la participación de la metionina sintasa (MS) y 2. Por la vía de la transulfuración hacia cistationa y cisteína. La enzima responsable del metabolismo de la Hcy a cistationa es la cistationa β sintasa (CBS) en presencia de piridoxina (vitamina B₆) como cofactor^{146,177}. Debido a que la MS posee una constante de Michaelis-Menten (K_M) más baja que la CBS, a menor concentración de Hcy se favorece la síntesis de Met y viceversa. A mayor concentración de Hcy se promueve la vía de la transulfuración, protegiendo al organismo del potencial tóxico de la Hcy. De este modo, cuando se incrementa la concentración de Met, la Hcy se metaboliza por la vía de la transulfuración. Por el contrario, si existe déficit de Met, la Hcy se remetila hacia Met¹⁶⁷. La remetilación de Hcy hacia Met se realiza en el hígado y en el riñón con la participación de la betaína homocisteína metiltransferasa (BHMT). No obstante, en la mayoría de los tejidos la Hcy se remetila a Met por acción de la MS, de la vitamina B₁₂ (cianocobalamina) y del 5-MTHF. El 5-MTHF actúa como donante de grupos metil en la conversión de Hcy a Met. La enzima 5,10-MTHFR convierte el tetrahidrofolato (THF) en 5-MTHF¹⁵¹. En la figura 25 se esquematiza el ciclo metabólico de la Hcy y su relación con los folatos.

El ciclo metabólico de la Hcy incluye (Figura 25): 1. Conversión de la Met de la dieta a SAM, a través de la metionina adenosil transferasa (MAT) o SAM sintasa. La SAM se sintetiza a partir de la transferencia de la adenosina del ATP, al grupo sulfhidrilo de la Met.

2. Reacciones de transferencia de grupos metil (~40 enzimas diferentes y más de 100 reacciones). Metilación de pequeñas moléculas (aminoácidos, aminas, lípidos) y de macromoléculas (DNA, RNA, proteínas). 3. Hidrólisis de S-adenosil-homocisteína (SAH) por la SAH-hidrolasa (SAHh), generando adenosina y Hcy. La SAH es un inhibidor de las metiltransferasas del DNA (DNMT) dependientes de la SAM. La Hcy puede ser remetilada hacia Met por la metionina sintasa (MS) o por la betaína homocisteína metiltransferasa (BHMT) y/o ser convertida a cistationa mediante la cistationa β sintasa (CBS). El exceso de Hcy se transporta hacia la circulación, uniéndose a las proteínas y a otras moléculas como la cisteína. 4. Remetilación de Hcy a Met por acción de la MS y de la BHMT en presencia de 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) y de vitamina B₁₂. 5. Transulfuración de Hcy a cisteína y glutatión (reacción doblemente depende de vitamina B₆). La CBS es la enzima limitante de esta reacción 145. La cistationa se convierte a cisteína y cetobutirato por mediación de la cistationa-q-liasa (CSE)¹⁷⁵. El ciclo de los folatos interactúa con el ciclo de la Hcy en el paso 4. El grupo metil del 5-MTHF se transfiere a la Hcy para formar tetrahidrofolato (THF). El ciclo de los folatos se reinicia a partir de una serie de reacciones complejas (paso 6) no detalladas en el esquema. La enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) transforma el 5,10-MTHF en 5-MTHF (paso 7). El paso 8 hace alusión a la reacción esencial mediada por la serina hidroximetil transferasa (SHMT).

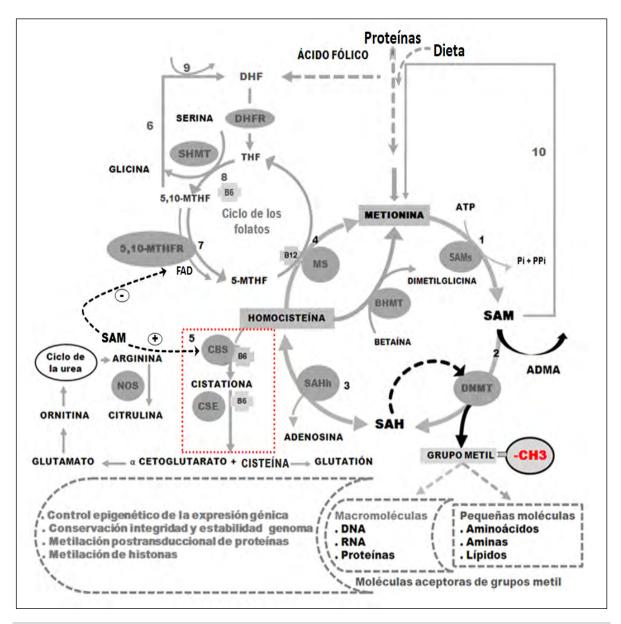


Figura 25. Ciclo metabólico de la homocisteína. Interrelación entre la homocisteína (Hcy), los folatos y la relevancia de la S-adenosil-metionina (SAM) en las reacciones de transferencia de grupos metil. La Hcy es un intermediario en el metabolismo de la metionina (Met), siendo mediadora de las reacciones de transmetilación celular, incluyendo la metilación del DNA (ácido desoxiribonucléico). El ácido fólico abastece el *pool* de THF, indispensable para la actividad de la MS. Sin embargo, el ácido fólico incrementa la SAM. La SAM es donante de grupos metil y precursora de la dimetilarginina asimétrica (ADMA). La ADMA produce falta de acoplamiento e inhibición de la sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS), disminución de la disponibilidad de óxido nítrico (NO') y disfunción endotelial. El glutatión es el producto final del metabolismo de la cisteína y posee actividad antioxidante. No obstante, la alteración en la vía de la transulfuración disminuye su capacidad antioxidante en las células. Las mutaciones en los genes que codifican las enzimas MTHFR y CBS alteran la conversión de Hcy a Met y cistationa, generando hiperhomocisteinemia (HHcy). La HHcy obedece adicionalmente al déficit de ácido fólico y de vitaminas B₆ y B₁₂, ya que ambas vitaminas son cofactores esenciales en el metabolismo de la Hcy¹⁴⁵. La metilación del DNA está implicada en: a. La inactivación cromosómica. b. La estabilidad e integridad del genoma. c. El silenciamiento génico¹⁴⁰. Pi (fosfato inorgánico); PPi (pirofosfato inorgánico). La nomenclatura alusiva al ciclo metabólico de la Hcy de esta gráfica se detalla en el parágrafo inmediantamente precedente. Adaptada de: *Ingrosso D, Perna A. Biochimica et Biophysica Acta*. 2009;1790:892-899¹⁵¹ y *Maron BA, Loscalzo J. Annu Rev Med*. 2009;60:39-54¹⁴⁵.

De la figura 25 se infiere que 145,151:

- 1. El metabolismo de la Hcy se realiza por tres vías: a. Remetilación de Hcy a Met mediante la MS, con la participación del 5-MTHF y de la vitamina B_{12} . b. Transulfuración. A través de esta vía la Hcy se transforma en cisteína con la participación de la CBS y de la vitamina B_6 (piridoxina). c. Remetilación de Hcy a Met en algunos tejidos (riñón e hígado) por la vía de la BHMT¹⁷⁸.
- 2. La Hcy está conformada sustancialmente por la estructura del carbono de la Met. Por consiguiente, la Hcy es en esencia la Met sin su grupo metil, ya que ha transferido dicho grupo en la vía de la transmetilación celular.
- 3. La Hcy tiene varios destinos: a. Intermediario metabólico en la transferencia de grupos metil desde el THF a la SAM. b. Remetilación de Hcy hacia Met, siendo la Met fuente donante de grupos metil. c. Ruta menor de remetilación de Hcy, y de la colina de la dieta, con la participación de la BHMT (una enzima limitada al hígado). d. Mediante la vía de la transulfuración, la SAH hidrolasa (SAHh) hidroliza la SAH generando adenosina y Hcy. El exceso de Hcy se oxida a taurina o hacia sulfatos inorgánicos. e. La Hcy alcanza el espacio extracelular y el plasma siendo eliminada posteriormente en la orina. f. Producción de homocisteinil-tRNA-Met (Hcy-tRNA-Met). Mediante esta vía equívoca de síntesis protéica se selecciona erróneamente Hcy en lugar de Met favoreciendo la metilación de la Hcy-tRNA-Met hacia Met-tRNA-Met y la consiguiente producción de radicales libres, en especial de Hcy-T (un intermediario químico supremamente perjudicial para las células).
- 4. En la vía metabólica de la Hcy existen tres enzimas primordiales: MTHFR, MS y CBS. La mutación de los genes que codifican la MTHFR y la MS alteran la conversión de Hcy a Met. La mutación del gen que codifica la CBS altera la conversión de Hcy a cistationa. El ácido fólico (vitamina B₉) y las vitaminas (B₆ y B₁₂), son cofactores esenciales para el funcionamiento de estas enzimas, así como para el metabolismo de la Hcy. Luego, el déficit de estas vitaminas incrementa la Hcy.

- 5. El aclaramiento de Hcy se realiza mediante su transulfuración a cisteína.
- 6. Las metiltransferasas del DNA (DNMT) son enzimas bifuncionales, ya que forman derivados metilados a partir de varios sustratos y garantizan la formación de Hcy, un intermediario obligado en la compleja vía de la Met (un aminoácido esencial) hacia cisteína (un aminoácido no esencial).
- 7. Parte de las reacciones de transmetilación y de la producción de Hcy acontecen en el hígado. La metilación de las macromoléculas (DNA, RNA y proteínas) ocurre en todo el organismo.
- 8. Las reacciones de metilación de las micromoléculas (aminoácidos, aminas, lípidos), contribuyen a la producción de SAH y de Hcy. La SAH regula la actividad de las DNMT.
- 9. La MS también es una enzima bifuncional, ya que participa en el ciclo de los folatos y en el metabolismo de la Hcy. El 5-MTHF actúa como cofactor de la MS. El THF se restablece después de la transferencia de su grupo metil, reingresando al ciclo de los folatos.
- 10. El ácido fólico repleta el *pool* de THF, el cual es indispensable para el funcionamiento de la MS. No obstante, el ácido fólico incrementa la SAM. La SAM es a su vez fuente donante de grupos metil y precursora de la ADMA. La ADMA produce falta de acoplamiento enzimático e inhibición de la eNOS, reduciendo la biodisponibilidad de NO y alterando la función del endotelio vascular.
- 11. El glutatión es el producto final del metabolismo de la cisteína y posee actividad antioxidante. La alteración en la vía de la transulfuración disminuye la capacidad antioxidante de las células. En consecuencia, el incremento de Hcy por esta vía, representa una ruta alterna que justifica la fisiopatología del proceso oxidativo afín a varias entidades que cursan con HHcy.

9.1.1 S-adenosil-homocisteína

La SAH es un producto dependiente de las reacciones de transferencia de grupos metil de la SAM y el único precursor metabólico *in vivo* de la Hcy en los tejidos. La SAHh cataliza la reacción enzimática (reversible) que transforma la SAM en SAH. La SAH es a su vez un poderoso inhibidor competitivo de las DNMT dependientes de la SAM. Las DNMT actúan en los tejidos y poseen características estructurales que les permiten reconocer y captar la SAM o la SAH¹⁵¹ (su derivado demetilado). Debido a que la SAH inhibe las DNMT (incluyendo la remetilación de Hcy a Met), la SAH es crucial en la regulación de todas las reacciones de transmetilación. La SAHh se expresa en el riñón y actúa en estrecha afinidad con las DNMT tornando más eficientes las reacciones de transmetilación celular¹⁷⁸.

Los productos derivados del metabolismo de la SAH (adenosina y Hcy) se eliminan rápidamente evitando así el incremento de la SAH y la consecuente inactivación de las DNMT. Cuando se aumenta la Hcy, se incrementa también su precursor, la SAH, alterando la relación SAM/SAH e inhibiendo las reacciones de transmetilación celular. Luego, la relación SAM/SAH constituye un buen indicador del grado de metilación celular^{16,151}.

Se desconocen los mecanismos que protegen al organismo contra el incremento de la SAH. Al igual que sucede con la concentración de Hcy plasmática, la SAH se relaciona inversamente con la tasa de filtración glomerular. No obstante, la SAH es más sensible que la Hcy a la reducción de la tasa de filtración glomerular. En los pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC), la SAH se incrementa en ~45 veces, la SAM en ~6 veces y la Hcy en ~4 veces más. El riñón regula la concentración plasmática de SAH. Del mismo modo, el riñón ejerce efectos directos sobre el metabolismo de los aminoácidos sulfurados e indirectos sobre las reacciones de transferencia de grupos metil. El *pool* extracelular de SAH se renueva en los tejidos y en los riñones varias veces al día¹⁷⁸ (Figura 26).

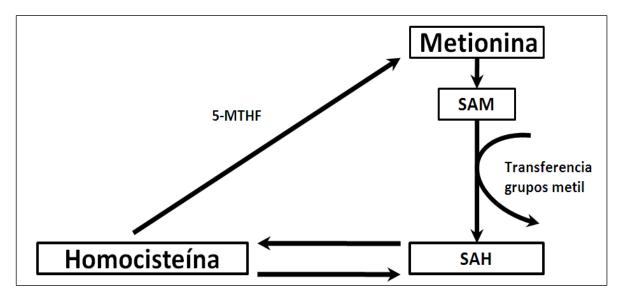


Figura 26. Conversión metabólica de metionina a homocisteína. Metionina (Met); homocisteína (Hcy); SAM (S-adenosil-metionina); SAH (S-adenosil-homocisteína); 5-MTHF (5-metiltetrahidrofolato). Gráfica adaptada de: *Gariboto G, et al. Kidney Int.*2009;76:293-296¹⁷⁸.

9.2 Factores que determinan la concentración de homocisteína

Entre los principales determinantes de los niveles de Hcy debemos considerar diversos factores: fisiológicos, genéticos, demográficos, adquiridos (nutricionales, hábitos de vida, medicamentos) y enfermedades sistémicas, entre otras circunstancias. La HHcy moderada (15-30 μ mol/L) generalmente obedece a la deficiencia de folatos, a la variante C677T MTHFR, a los defectos heterocigóticos de la CBS, al hipotiroidismo, a la alteración de la función renal y al uso de fármacos que afectan el metabolismo de la Hcy y/o de los folatos. La HHcy intermedia (30-100 μ mol/L) se produce por deficiencia moderada de vitamina B₁₂ y folatos o insuficiencia renal. La principal causa de HHcy severa (100-400 μ mol/L) es consecuencia de la deficiencia extrema de vitamina B₁₂ y a la homocistinuria. La homocistinuria incluye la deficiencia de las enzimas (CBS, MTHFR, MS) y los defectos en el metabolismo intracelular de la vitamina B₁₂ ¹⁵⁰.

9.2.1 Determinantes genéticos

Los factores genéticos comprenden diversas alteraciones en los genes que codifican la expresión de las enzimas involucradas en la vía metabólica de los folatos: 1. El gen de

la MTHFR (ubicado en el cromosoma 1p36.3). 2. El gen de la MS (localizado en el cromosoma 1q43). El gen que codifica la metionina sintasa reductasa (MSR) confinado al cromosoma 1p15.3-p15.2 y 3. El gen que regula la CBS (con localización cromosómica 21q22.3).

Se han identificado además de las mutaciones responsables de la HHcy hereditaria severa, algunos polimorfismos que promueven incrementos menos pronunciados (leves a moderados) en la Hcy¹⁰⁴.

La homocistinuria como consecuencia de la deficiencia de la CBS es una enfermedad mendeliana excepcional y está en relación con el desarrollo de ATS severa y de complicaciones trombóticas en el lecho vascular¹⁵⁰. En la HHcy (leve/moderada), además del polimorfismo C677T, la Hcy está influenciada por las variantes en los genes PON1 y PON2. Estas variantes regulan la actividad y la concentración de sus respectivas isoenzimas a través de su capacidad para hidrolizar distintas lactonas, entre ellas la Hcy-T^{20,21}

Adicionalmente, el NO' regula la concentración de Hcy: 1. De forma directa, al inhibir la actividad de la MS. 2. Indirectamente, a través del catabolismo de los folatos, al inhibir la síntesis de la ferritina (proteína que inhibe irreversiblemente el metabolismo oxidativo de los folatos, incrementando su concentración intracelular). Debido a que el nivel de folatos se relaciona inversamente con la Hcy, se establece una correspondencia reciproca entre la concentración de NO' y la concentración de Hcy¹⁰⁴.

9.2.1.1 Polimorfismo C677T MTHFR

El polimorfismo C677T MTHFR es la variante hereditaria más frecuente y estudiada como causa de HHcy moderada. Su prevalencia es variable entre los diferentes grupos étnicos y raciales. Este polimorfismo presenta un patrón de herencia mendeliana autosómico recesivo^{179,180}.

Los estudios pioneros de la enzima MTHFR realizados por Kang y cols. 181,182, identificaron una variante termolábil de la enzima con menor actividad, relacionada con el incremento de Hcy y el riesgo de desarrollar EC. La alteración que ocasiona la termolabilidad de la enzima consiste en un defecto de transición del gen que codifica la enzima MTHFR. Una modificación en la estructura del DNA en la que el residuo de citosina (C), se sustituye por timina (T) en el nucleótido 677 del exón 4 del gen. La sustitución de estos nucleótidos genera el cambio del aminoácido valina (Val), por alanina (Ala) en la posición 114 de la enzima MTHFR (Ala222Val).

El polimorfismo C677T codifica en el alelo T¹⁸⁰ una enzima menos eficiente en el metabolismo de la Hcy (~30% en los heterocigotos y ~60% en los homocigotos) impidiendo la formación del 5-MTHF¹⁷⁹. Frosst y cols.¹⁷⁹, señalaron que esta variante incrementaba ~25% la concentración de Hcy en los individuos homocigóticos para el alelo T (genotipo TT), en comparación con los individuos que no portaban el alelo de riesgo (genotipo CC). Desde el reporte original de Frosst y cols. en 1995, el polimorfismo C677T MTHFR ha sido objeto de investigación como FR genético en el desarrollo de las ECV.

Kang y cols. ^{181,182}, mostraron que no todas las personas con termolabilidad de la MTHFR presentaban incremento de Hcy. Estos investigadores señalaron que el aporte de folatos reducía la Hcy en los individuos con HHcy. En concordancia con estas observaciones, Jacques y cols. ¹⁸³, reportaron HHcy moderada en individuos homocigotos para el alelo T (T/T) con deficiencia de folatos. Diferentes estudios han revelado que la actividad de la MTHFR se incrementa cuando la concentración de folatos es adecuada, disminuyendo la Hcy. Si bien la disminución de folatos está en relación con la HHcy moderada, la contribución de este hallazgo *in vivo* en la aterogénesis se encuentra en entredicho ¹⁰⁴.

Bagley y Selhub¹⁸⁴, encontraron que la expresión clínica del polimorfismo C677T obedece a la distribución diferenciada de los folatos en el interior de las células (glóbulos

rojos, CE, entre otras células). Así, los homocigotos CC almacenan exclusivamente 5-MTHF en los glóbulos rojos, optimizando el metabolismo de la Hcy en las células. Los homocigotos TT, además del 5-MTHF, almacenan derivados no metilados de los folatos como el THF. En consecuencia, los heterocigotos CT presentan modesto incremento en la Hcy respecto a los homocigotos CC.

Debido a que la Hcy constituye un FR en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica, el enunciado anterior predice que los tres genotipos del polimorfismo C677T MTHFR confieren diferentes niveles de riesgo aterotrombótico en la población genéticamente vulnerable¹⁸⁵. Una explicación propuesta a este hallazgo es que el genotipo CT confiere mayor riesgo aterotrombótico. Aunque otra interpretación establece que el genotipo CC ejerce efecto protector contra la ATB.

Recientemente y siguiendo la metodología investigativa del gen candidato, se evaluó la variante C677T MTHFR en diferentes estudios clínicos controlados randomizados, corroborando que los portadores del genotipo C677T presentan incremento de la Hcy, a la vez que el aporte exógeno de folatos disminuye su concentración¹⁸⁶. Estos hallazgos han sido confirmados en el primer *Scan* GWAS a gran escala de la Hcy plasmática¹⁴. La variación más significativa en este sentido se encontró en el cromosoma 1, específicamente en el gen que codifica la enzima MTHFR (Figura 27).

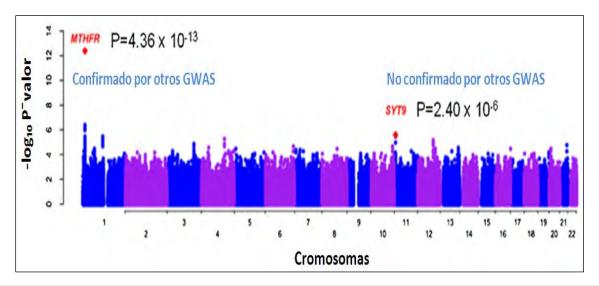


Figura 27. *Scan* **GWAS** de la homocisteína. *Scan* graficado de acuerdo a la posición de los cromosomas y al -valor de p del -log₁₀. GWAS (*genome-wide association study*); MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa); SYT9 (proteína *synaptotagmi*n-9). Adaptada de: *Miyaki K. J Epidemiol.* 2010;20(4):266-270¹⁴ y *Tanaka T, et al. Am J Hum Genet.*2009;84(4):477-482¹⁸⁶.

9.2.2 Factores demográficos

Diversos factores demográficos determinan la concentración de Hcy¹⁰⁴.

9.2.2.1 Género

Biológicamente existe un nivel superior de Hcy plasmática en el género masculino. Este hallazgo se atribuye a la mayor proporción de masa muscular en los hombres. Si bien se presume que esta diferencia en la concentración de Hcy con el género femenino (la cual desaparece con la menopausia) refleja el efecto de los estrógenos sobre el metabolismo de la Hcy. Este hecho justificaría la mayor prevalencia de EC en el género masculino y la observación epidemiológica del incremento de EC en las mujeres posmenopáusicas, ya que los estados de deficiencia estrogénica se asocian a HHcy. A su vez, la terapia de remplazo hormonal con estrógenos, disminuye la Hcy en la mujer posmenopáusica. Se desconoce si el efecto cardioprotector asociado a la terapia hormonal obedece a la disminución de Hcy¹⁴⁵. Recientemente se identificó en un GWAS el locus del gen CPS1 (*carbamoyl-phosphate synthetase 1*) el cual regula la concentración de Hcy en

las mujeres, encontrando que la Hcy varía en las diferentes etapas del desarrollo. Este hecho sugiere una importante actividad de la MTHFR en la población joven¹⁸⁷.

9.2.2.2 Envejecimiento

A lo largo del proceso de envejecimiento se incrementa la Hcy, aunque se desconocen los mecanismos involucrados en dicho proceso. Se atribuye este hallazgo a la baja ingesta de vitaminas del complejo B, al deterioro de la función renal y/o a la reducción de la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de estas vitaminas 188. En la tercera edad la Hcy se incrementa ~1μmol/L por cada década (~15-20% en las personas mayores de 65 años) 145. Algunos autores encuentran relación entre Hcy, y la edad exclusivamente en homocigotos TT que padecen EC (variante C677T MTHFR). En las personas con genotipo TT el rango de Hcy superior a 15 μmol/L se relaciona con la EC. Por el contrario, en los individuos con los genotipos CT y CC (incluso con valores superiores de Hcy) no se ha encontrado relación con la edad, ni con la presencia de EC. Estos resultados indican que el genotipo TT se asocia con EC cuando coexiste HHcy. También se ha documentado que la HHcy (así como sus determinantes genéticos), desempeña una función preponderante en los pacientes jóvenes que desarrollan IAM 189.

9.2.3 Factores nutricionales

Aproximadamente el 60% de la HHcy de origen nutricional obedece a la deficiencia de las vitaminas del complejo B (B₆, B₉ y B₁₂) implicadas en el ciclo metabólico de la Hcy¹⁸⁸ (Figura 34). El consumo frecuente de carne roja (por su alto contenido en Met) predispone al desarrollo de ATS¹⁹⁰ al igual que el consumo de café¹⁹¹, ya que aumentan la Hcy. Por el contrario, la dieta mediterránea (alto consumo de folatos) reduce la Hcy¹⁹².

La dieta es un determinante fundamental de la concentración de Hcy debido a que condiciona la fuente donante de grupos metil a través del aporte de ciertos nutrientes, especialmente de aquellos alimentos que contienen folatos, colina, betaína y Met. Por consiguiente, la dieta regula el metabolismo de los aminoácidos sulfurados (como la Hcy) y

las reacciones de transferencia de grupos metil a nivel celular. Esta particularidad acrecienta la relevancia de la Hcy como biomarcador ya que la dieta rica en vegetales verdes y ácido fólico disminuye la concentración de Hcy, y *viceversa*¹⁰⁹. Existe relación inversa entre la concentración de Hcy, ácido fólico y la metilación del DNA^{193,194}, un aspecto biológico imprescindible en la expresión génica¹⁹⁴⁻¹⁹⁷ (Figura 34). Algunos estudios evidencian que la variante C677T MTHFR se asocia a hipometilación del DNA¹⁹⁷.

En la población general el aporte de folatos favorece el metabolismo de la Hcy al reducir su concentración plasmática, inclusive en personas que presentan Hcy en rangos fisiológicos¹⁵⁰. Debido a que los depósitos de ácido fólico en el organismo son escasos (~5-20 mgr), las entidades que aumentan su demanda en la dieta y/o que alteran su absorción en el yeyuno proximal, alteran los niveles de ácido fólico¹⁴⁵ (Tabla 5).

Tabla 5. Causas más habituales de la deficiencia de folatos

Malabsorción	Aumento de utilización	Aumento de pérdida
Esprue tropical Enteropatía por gluten Resección intestinal o gástrica amplia Enfermedades inflamatorias del intestino Enfermedad de Crohn Colitis ulcerativa Enteropatía diabética	Embarazo Lactancia Prematuréz Alcoholismo Enfermedades hematológicas crónicas: anemia hemolítica, anemia falciforme y mielofibrosis Enfermedades oncológicas: neoplasias, linfomas, leucemia, mieloma múltiple	Insuficiencia cardiaca congestiva Enfermedad hepática activa Hemodiálisis, diálisis peritoneal Alcoholismo Enfermedades inflamatorias crónicas que aumentan la demanda de folatos pero disminuyen el apetito (tuberculosis, enfermedad de Crohn, psoriasis, etc.)

Tomada de: Maron BA, Loscalzo J. Annu Rev Med. 2009;60:39-54¹⁴⁵.

La vitamina B_{12} es fundamental para la actividad de la MS. Esta vitamina no se sintetiza de *novo* en los humanos, por ende, sus depósitos dependen exclusivamente del aporte de la dieta. A diferencia del acido fólico, la vitamina B_{12} se encuentra exclusivamente en la carne o en alimentos de origen animal, lo que torna a los vegetarianos estrictos al déficit de esta vitamina. La absorción de la vitamina B_{12} en el yeyuno distal requiere del factor intrínseco producido conjuntamente en el estómago con el ácido hidroclorhídrico. Por ello, los individuos que padecen aclorhidria, disminución del factor intrínseco, insuficiencia exocrina del páncreas, personas con historial de

vitamina B₁₂. Por este motivo, al menos en parte, las personas de la tercera edad son más

susceptibles a la deficiencia de esta vitamina (Tabla 5).

La disminución de la vitamina B₁₂ altera la actividad de la MS e incrementa la Hcy, además de afectar el metabolismo del 5-MTHFR, favoreciendo el aumento del THF. No obstante, en estas circunstancias el THF no actúa eficazmente como precursor del 5-MTHF. Incluso mediante el aporte de ácido fólico su efecto biológico no se traduce en la reducción de la Hcy esperada. Por esta razón la terapia de la HHcy debe incluir tanto ácido fólico, como vitamina B₁₂. Esta combinación garantiza que los cofactores de la MS sean apropiados y se promueva el metabolismo del THF y la remetilación de la Hcy a Met¹⁴⁵.

La vitamina B_6 es indispensable para la actividad enzimática de la CBS. La vitamina B_6 se encuentra en todos los alimentos y se almacena en el hígado, lo que hace que esta deficiencia nutricional sea poco habitual. Sin embargo, los individuos con enfermedad hepática y estado nutricional precario (como sucede en los alcohólicos) son propensos al déficit de esta vitamina. Las manifestaciones clínicas de la deficiencia de vitamina B_6 no se relacionan con HHcy aunque los estudios observacionales han reportado mayor riesgo de tromboembolismo venoso recurrente. En las enfermedades asociadas a deficiencia de 5-MTHF y de vitaminas B_6 y/o B_{12} coexiste HHcy, siendo el aporte de estos sustratos sus principales blancos terapéuticos 145,150 .

9.2.4 Factores ambientales

La HHcy como FRECV constituye uno de los fenotipos de riesgo inherentes a los fumadores¹⁹⁰. La HHcy yace como efecto aterogénico añadido a los efectos perniciosos del tabaco (tanto en fumadores activos como pasivos)¹⁹⁸. Simultáneamente, el tabaquismo inhibe la eNOS¹⁹⁹.

9.2.5 Enfermedades asociadas a hiperhomocisteinemia

En la tabla 6, se describen diversas patologías relacionadas con HHcy e incremento del riesgo cardiovascular²⁰⁰.

Tabla 6. Entidades que cursan con incremento de homocisteína 145,200

Enfermedades que causan déficit de ácido fólico y vitaminas del complejo B*

Enfermedades digestivas

Esprue tropical, enteropatía por gluten, resección intestinal o gástrica amplia, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enteropatía diabética, infección por Helicobacter Pylori

Alteraciones hepáticas incluyendo la enfermedad hepática de origen alcohólico

Complicaciones de la gestación

Trombosis venosa profunda, aborto recurrente espontáneo, preeclampsia, abruptio placentae

Afecciones neurológicas, psiquiátricas y neurodegenerativas²⁰¹

Demencia, autismo, esquizofrenia, depresión, defectos del tubo neural

Enfermedades sistémicas^{78,145,202}

Diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica, hipotiroidismo, neoplasias y leucemias, enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y la psoriasis

Síndromes genéticos 145,150

Déficit de cistationa β sintasa (CBS), metionina sintasa (MS) y metionina sintasa reductasa (MSR)

Polimorfismo C677T de la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

Síndrome de Down²⁰³

Trasplante de órganos 145,150

9.2.6 Medicamentos asociados a hiperhomocisteinemia

Diversos fármacos incrementan la concentración de Hcy. Al margen se describen algunos de ellos (Tabla 7).

Tabla 7. Medicamentos que incrementan la homocisteína 145,150, 200

Antifolatos

Trimetoprim

Antimetabolitos e inmunosupresores

Sulfazalazina, metrotexate

Anticonvulsivantes

Fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, ácido valpróico

Metilxantinas 191

Cafeína y otras metilxantinas

Andrógenos

Hipolipemiantes²⁰⁴

Ácido nicotínico, fibratos

Antidiabéticos orales²⁰⁵

Metformina

Antihipertensivos y diuréticos*206

Anestésicos

Óxido nitroso²⁰⁷

^{*}En la tabla 6, se exponen las causas más frecuentes de deficiencia de folatos 145.

^{*}Algunos antihipertensivos y diuréticos aumentan la concentración de homocisteína, a diferencia de los bloqueantes de los receptores β adrenérgicos y de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) que la disminuyen.

9.2.7 Otros factores relacionados con hiperhomocisteinemia

El nexo existente entre el incremento de la concentración plasmática de Hcy y la iatrogenia secundaria al uso y abuso de medicamentos representa una causa frecuente y relevante de HHcy como FRECV²⁰².

9.3 Valores de referencia de la homocisteína

La tHcy depende del balance entre la producción y el metabolismo de la Hcy. La Hcy plasmática se encuentra en el 99% en su forma oxidada y el 1% en forma reducida. En el plasma humano existen una variedad de Hcy inestables: Hcy unida a proteínas, Hcy como compuestos disulfuro y Hcy como compuestos sulfhidrilo¹⁴⁵. Aproximadamente el 80-90% de la Hcy plasmática se encuentra unida a las proteínas (bHcy), en particular a la albúmina (su mayor reservorio plasmático). La mitad de la bHcy está unida a las proteínas mediante puentes disulfuro y la otra mitad a través de enlaces amida (más estables). No obstante, cuando nos referimos al total de la sangre (no al plasma únicamente), esta proporción solo alcanza el 22%, ya que el mayor *pool* de Hcy (75%) está constituido por la hemoglobina. El 1% de la Hcy se encuentra en la grasa como Hcy libre (fHcy) u Hcy no unida a proteínas. El resto de la Hcy (10-20%) circula como compuestos intermedios de su metabolismo. El grupo sulfhidrilo (SH o tiol/thiol) de la Hcy se une mediante puentes disulfuro a otra Hcy formando homocistina (Hcy-S-S-Hcy), a la cisteína conformando disulfuros de homocisteína-cisteína (Hcy-S-S-Cys) y a otros grupos SH de diversas proteínas plasmáticas.

La suma de los diferentes tipos de Hcy conforma lo que conocemos como tHcy. Las técnicas de laboratorio actualmente disponibles detectan en conjunto los diferentes tipos de Hcy, expresándola como tHcy en μmol/L. Según la opinión de los expertos^{73,150}, el rango normal de tHcy oscila entre 5-15 μmol/L, aunque algunos autores consideran HHcy al rango de tHcy superior a 12 μmol/L¹⁴⁵.

tHcy = bHcy + fHcy, en donde:

.tHcy es homocisteína (Hcy) plasmática total

.bHcy es Hcy unida a proteínas

.fHcy es Hcy libre (Hcy no unida a proteínas)

En circunstancias fisiológicas existe equilibrio en la redistribución de la fHcy y la bHcy. Se desconoce el mecanismo mediante el cual la Hcy abandona la célula, si bien se ha descrito un sistema transportador para la Hcy. El grupo amino de la Hcy-T posee una constante pK (constante de equilibrio) inusualmente baja (~7.1) que le permite reaccionar a pH (*pondus hydrogenii/potentia hydrogenii*) fisiológico como molécula neutra y rebasar libremente la membrana celular. Los riñones son responsables del aclaramiento de más del 70% de la Hcy, siendo la función renal determinante esencial de su concentración plasmática. Existe relación directa entre la concentración de creatinina sérica y la tHcy tanto en personas sanas, como en individuos con ECV¹⁷⁸.

9.4 Homocisteína y estrés oxidativo

9.4.1 Especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno

La HHcy estimula la NADPH oxidasa y la iNOS aumentando la producción de radicales superóxido en los vasos sanguíneos (arterias coronarias). La HHcy moderada altera la función de las enzimas antioxidantes intracelulares como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. La autooxidación de Hcy hacia homocistina y la oxidación de Hcy a Hcy-T generan ROS, contribuyendo a explicar la toxicidad vascular de la Hcy. La HHcy aumenta la ADMA y por ende las ROS. Adicionalmente, la HHcy promueve falta de acoplamiento enzimático de la eNOS. Todos estos factores incrementan la producción de radicales superóxido, los cuales reaccionan con el NO* para formar radicales peroxinitrito y

9.4.2 Homocisteína y señalización redox

La vía de la señalización *redox* representa el proceso celular mediante el cual los radicales libres, las ROS y las RNS (las cuales se activan mediante transferencia de electrones) intervienen como mensajeros en los diferentes sistemas biológicos. El estado prooxidativo inducido por la HHcy favorece diferentes mediadores de la inflamación (como el NF-kB) responsables de la transcripción de múltiples genes proinflamatorios. Los estudios en cultivos celulares han mostrado que el estrés oxidativo y la Hcy *per se* producen un efecto mitogénico en las VSMC. Además, la Hcy promueve la oxidación de las LDL y la expresión del receptor LOX-1 (*lectin-like oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor*) en la superficie celular, favoreciendo la formación de células espumosas y la ATS. La alteración en la vía de la señalización *redox* ejerce diversos efectos aterogénicos en el endotelio vascular¹⁵⁰.

9.5 Homocisteína, eNOS, ADMA, DDAH y función endotelial

La Hcy incrementa el riesgo cardiovascular como resultado de su efecto deletéreo sobre la función endotelial. La relación entre Hcy, y disfunción endotelial es en gran medida dependiente del acoplamiento enzimático de la eNOS. La Hcy altera la expresión de la eNOS, interfiriendo con la vía de la señalización *redox* a nivel intracelular. A su vez, el estrés oxidativo promovido por la HHcy genera degradación oxidativa del NO°, contribuyendo a la disfunción del endotelio vascular^{145,150} (Figura 28). Aunque existen evidencias contundentes que relacionan la HHcy extrema, el estrés oxidativo y la disfunción del endotelio¹⁵, desconocemos en qué medida la Hcy (en rangos fisiológicos) interviene en la función vascular y/o en la génesis de las ECV, ya que los resultados de los estudios de asociación son contradictorios ¹⁶⁰⁻¹⁶⁵.

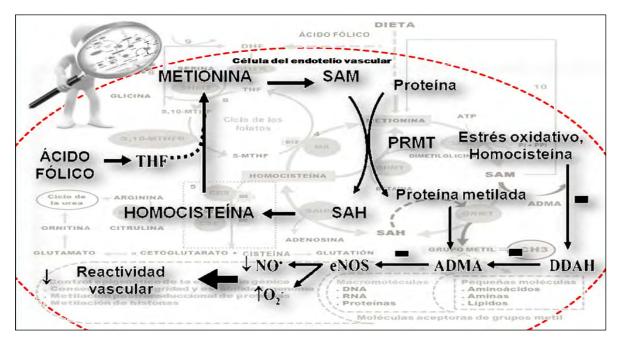


Figura 28. Homocisteína, folatos y ADMA. El ácido fólico abastece el *pool* de tetrahidrofolato (THF) y disminuye la concentración de homocisteína (Hcy) mediante la remetilación de Hcy a metionina (Met), disminuyendo la S-adenosil-homocisteína (SAH). No obstante, el ácido fólico incrementa la reserva intracelular de S-adenosil-metionina (SAM) la cual favorece la síntesis de ADMA (dimetilarginina asimétrica). La ADMA promueve falta de acoplamiento e inhibición de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS), incremento de anión superóxido (O₂⁻) y disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO⁻) alterando la función del endotelio vascular. Las dimetilarginina dimetilaminohidrolasas (DDAH) degradan la ADMA. Sin embargo, diversos productos del metabolismo oxidativo (incluyendo el estrés oxidativo promovido por la Hcy) alteran las DDAH. PRMT (N-metiltransferasa de la L-arginina). Adaptada de: *Maron BA, Loscalzo J. Annu Rev Med.* 2009;60:39-54¹⁴⁵ y Palm F, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;293:3227-3245¹⁷⁷.

A nivel experimental, la HHcy disminuye la L-arginina (sustrato indispensable para la actividad de la eNOS y precursora del NO') en las células endoteliales, generando falta de acoplamiento enzimático de la eNOS. La conversión de Met a Hcy activa la N-metiltransferasa de la L-arginina (PRMT) responsable de la metilación de la L-arginina hacia ADMA. El aporte exógeno de Met incrementa la concentración de ADMA. A su vez, el estrés oxidativo (incluyendo el proceso oxidativo promovido por la Hcy) disminuye la actividad de las DDAH, las enzimas implicadas en la degradación metabólica de la ADMA. En la HHcy el aumento de la producción de ADMA y su menor catabolismo incrementan su concentración. La ADMA inhibe la eNOS alterando la biodisponibilidad de NO' y la función del endotelio vascular.

Adicionalmente, el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria propia de la HHcy oxida la tetrahidrobiopterina (BH₄), cofactor primordial de la eNOS^{145,150} (Figura 28). En diferentes nosologías que cursan con HHcy, incremento del estrés oxidativo y alteraciones vasculares, coexiste menor biodisponibilidad de BH₄, ya que el BH4 es susceptible a la degradación oxidativa^{22,208}. Debido a que la HHcy incrementa la ADMA, se había inferido que la disminución de Hcy reduciría la ADMA. Sin embargo, la reducción de Hcy (mediante el aporte de folatos) no disminuye la ADMA, ya que los folatos aumentan el *pool* de Met^{145,151}, incrementando la conversión de L-arginina a ADMA^{150,208} (Figura 28).

Se ha descrito relación entre disfunción microvascular del lecho coronario y Hcy en individuos sanos, aunque dicha evidencia es contradictoria en la HHcy moderada. Antoniades y cols. 150, reportaron que en la HHcy crónica en los humanos esta aumentada la endotelina-1 (ET-1), una molécula vasoconstrictora involucrada en la aterogénesis. Por el contrario, en la HHcy aguda (experimental) inducida por Met, estos autores no confirmaron dicho hallazgo. Como consecuencia de estos hechos, los investigadores señalaron que el incremento de ET-1 representa un factor añadido a la HHcy, como causa de disfunción endotelial en los humanos. No obstante, los investigadores señalan la necesidad de realizar estudios destinados a la búsqueda de mecanismos adicionales mediante los cuales la HHcy altera el endotelio vascular.

9.6 Homocisteína y trombosis

La relación entre homocistinuria y trombosis vascular está suficientemente documentada¹⁴². La HHcy severa constituye un predictor independiente de los estados protrombótico y disfibrinolítico^{152,160}. Pese a ello, esta circunstancia no es tan evidente en la HHcy leve o moderada. Algunos autores¹⁶⁰ afirman que es poco probable que la variación de la Hcy (en rangos fisiológicos) se acompañe de diferencias relevantes en la homeostasia de la coagulación sanguínea. Se han descrito varios mecanismos que explican el vínculo entre el estado procoagulante y la HHcy¹⁵⁰ (Tabla 8).

Tabla 8. Mecanismos que relacionan la hiperhomocisteinemia y la trombosis

Lesión oxidativa del endotelio aunada a la pérdida de los efectos protectores del óxido nítrico

Pérdida de los mecanismos fisiológicos antitrombóticos

Activación de la agregación plaquetaria como consecuencia de la lesión oxidativa del endotelio

Disminución de la expresión de trombomodulinas

Activación de la proteína C y la antitrombina III

Incremento de la expresión del factor tisular en las células endoteliales

Aumento de la expresión de los factores de la coagulación II,V, X y XII

Incremento de la actividad plaquetaria mediante el aumento del ligando CD-40 en el plasma

Disfibrinogenemia y alteración de la fibrinólisis

Lligando CD-40 (complejo perteneciente a la superfamilia del TNF formado por una proteína estructural transmembrana y una molécula soluble de adherencia tisular); TNF (factor de necrosis tumoral). Información tomada de: Antoniades C, et al. Eur Heart J. 2009;30:6-15¹⁵⁰.

9.7 Homocisteína, folatos y función vascular

Los folatos y las vitaminas B_6 y B_{12} mejoran significativamente la biodisponibilidad de NO' y la función del endotelio vascular, al reducir la concentración de Hcy^{199} . Si bien, algunos estudios evidencian que el ácido fólico *per se* mejora la función vascular con independencia de su acción sobre la Hcy^{209} .

Los hallazgos de Antoniades y cols. 150, señalan que el ácido fólico y el 5-MTHF ejercen efectos directos sobre la pared de los vasos sanguíneos (mejorando la función del endotelio), ya que la estructura molecular del 5-MTHF es similar a la del BH4. En pacientes sometidos a CRC, el 5-MTHF aumenta la biodisponibilidad de NO' y disminuye la producción de radicales superóxido en los injertos vasculares (arteriales y venosos) con independencia de su actividad sobre la Hcy. El beneficio del 5-MTHF en la actividad endotelial se atribuye a su capacidad para eliminar los radicales peroxinitrito (la principal forma oxidada del BH4 *in vivo*), aumentando la biodisponibilidad del BH4 en la pared vascular. Adicionalmente, el 5-MTHF incrementa la dimerización, la actividad y el acoplamiento de la eNOS, mejorando la función vascular en pacientes con ATS avanzada (Figura 29).

Varios trabajos avalan el efecto de los folatos y particularmente de las vitaminas B₆ y B₁₂ en la regresión de la placa aterosclerótica²¹⁰. Los estudios de Antoniades y cols.¹⁵⁰,

señalan que el ácido fólico (a dosis bajas) mejora la distensibilidad de la aorta y de la arteria carótida en los humanos, además de generar efectos cardioprotectores por diferentes vías: 1. Preservación de los fosfatos de alta energía. 2. Acoplamiento enzimático de la eNOS. 3. Restablecimiento de la señalización *redox*. 4. Disminución de la muerte celular del tejido miocárdico.

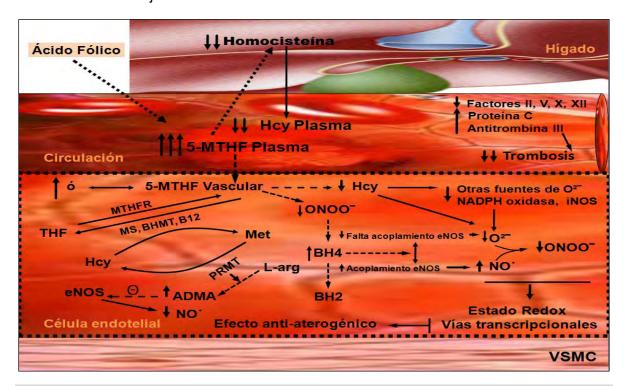


Figura 29. Homocisteína, folatos y aterosclerosis El ácido fólico incrementa la concentración de 5-MTHF en el plasma, aunque a nivel intracelular dicha acción es apenas modesta. En el endotelio vascular, el 5-MTHF disminuye la concentración de Hcy intracelular y la producción de superóxidos (O2⁻) por mediación de la NADPH oxidasa y de la iNOS (sintasa inducible del óxido nítrico). El 5-MTHF elimina los peroxinitritos (ONOO⁻), disminuyendo así la oxidación de la tetrahidrobiopterina (BH4), mejorando el acoplamiento de la sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS), la señalización redox a nivel vascular y la función endotelial. La enzima MTHFR utiliza el tetrahidrofolato (THF) como sustrato para la síntesis del 5-MTHF endógeno. El 5-MTHF se transforma nuevamente en THF y simultáneamente la homocisteína (Hcy) se metaboliza hacia Met (Figura 34). La conversión de Met (metionina) a Hcy activa la PRMT (N-metiltransferasa de la L-arginina), encargada de la metilación de la L-arginina (L-arg), formando dimetilarginina asimétrica (ADMA). La ADMA inhibibe la eNOS (Figura 37). La disminución de la Hcy en el hígado, reduce la síntesis de factores proaterogénicos e incrementa la producción de factores antitrombóticos. NADPH oxidasa (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized); VSMC (célula muscular lisa de los vasos sanguíneos). Tomada con modificaciones de forma de: Antoniades C, et al. Eur Heart J. 2009;30:6-15150.

9.8 Homocisteína, folatos y evolución clínica

En la HHcy crónica el aporte de folatos disminuye la predisposición a la trombosis, favorece los mecanismos de defensa antioxidantes y disminuye los marcadores del estrés oxidativo¹⁵⁰. A pesar de ello, a la luz actual los estudios clínicos randomizados no han

demostrado que la disminución de la Hcy se traduzca en beneficios en la prevención secundaria de las ECV¹⁶⁰⁻¹⁶⁵. En consecuencia, se ha concluido que el suplemento de folatos con el objeto de aminorar la concentración de Hcy no reduce el riesgo cardiovascular^{211,212}. Aunque el aporte de folatos y de vitaminas B₆ y B₁₂ reduce la Hcy, todavía es objeto de estudio que personas se benefician de dicha pauta¹⁴⁵.

Se han propuesto diversas explicaciones a la inconsistencia encontrada entre los estudios epidemiológicos y los estudios de intervención sobre el aporte de folatos en la dieta¹⁵⁰:

- 1. La enfermedad vascular aterotrombótica se genera como consecuencia de la alteración de múltiples vías de la señalización celular, generando cambios en la arquitectura y en la función de las células en un período tiempo largo. Se argumenta que no es factible establecer el riesgo atribuible de la HHcy leve en la aterogénesis exclusivamente en base a los estudios observacionales. Se ha propuesto optimizar la *Odds* que garantice la adecuada selección de los pacientes que requieren intervención con folatos mediante la valoración del umbral de Hcy (aquella concentración de Hcy que produzca el estimulo suficiente para producir el efecto) por encima del cual, el riesgo atribuible a la Hcy (en la progresión de la enfermedad vascular) sea sustancial y modificable 145.
- 2. La diversidad de los efectos biológicos de los folatos ocasiona resultados contrarios a los esperados en el intento de reducir la concentración de Hcy mediante su aporte exógeno. En esta dirección, una explicación propuesta se fundamenta en la relación existente entre Hcy y metilación celular^{23,151}. Los folatos favorecen la remetilación de Hcy a Met (aumentando el *pool* de Met), disminuyendo la SAH e incrementando la SAM. La SAM regula las reacciones de metilación a nivel celular.

Adicionalmente, el aporte de folatos favorece la vía de la metilación celular, ocasionando: a. Metilación de los residuos de arginina e incremento de ADMA. b.

hipermetilación del promotor de varios genes proaterogénicos. c. Aumento de la expresión

de diversas moléculas proaterogénicas en las células del endotelio vascular 145,150 (Figuras

25 y 28).

3. Una tercera explicación planteada se deriva de la acción de los folatos sobre la

síntesis de la timidina, al estimular la proliferación de las células en la neoíntima de los

vasos sanguíneos, acelerando el proceso aterosclerótico en individuos con ATS

preexistente¹⁵⁰. Este hecho obedece a que los folatos son esenciales para la síntesis del

DNA y la proliferación celular 145,150. Como consecuencia de esta particularidad, se ha

reportado incremento no significativo en la incidencia de neoplasias en relación con la

intervención con folatos para reducir la Hcy^{160,161,213}.

4. Se presume que algunas especies altamente reactivas derivadas de la oxidación de

la Hcy (como los enlaces no protéicos) pudiesen ser mejores indicadores de la estimación

del riesgo cardiovascular que la Hcy per se. La oxidación de la Hcy puede derivar en la

formación de grupos disulfuro unidos a la propia Hcy o favorecer su unión a otros grupos

SH aumentando las ROS, alterando la señalización redox y la función antioxidante de

ciertas enzimas¹⁴⁵, como la glutatión peroxidasa 1. Se ha inferido que derivado de estos

hechos se altera el fenotipo de las células del endotelio vascular.

Existe evidencia científica de que la Hcy-T y la N-Hcy-p constituyen procesos afines a

la toxicidad de la Hcy en el endotelio vascular humano^{17,214} (Figura 30). Es perentorio

esclarecer si las especies reactivas derivadas de la oxidación de la Hcy, son mejores

indicadores del riesgo cardiovascular que la Hcy misma¹⁴⁵.

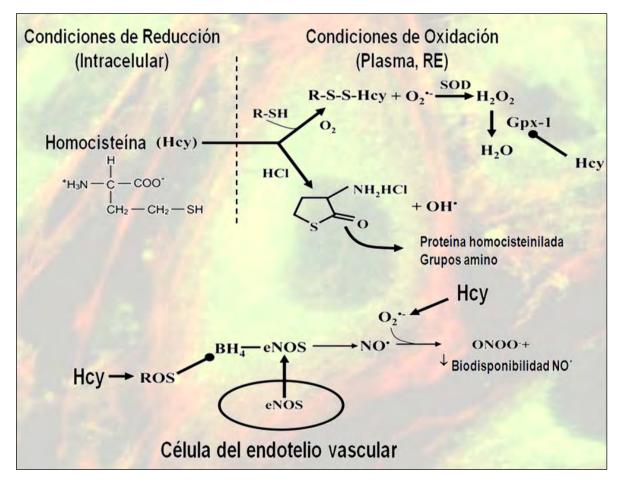


Figura 30. Auto-oxidación de la homocisteína. Margen superior. Bajo condiciones de oxidación como sucede en el plasma, la homocisteína (Hcy) "sufre" un proceso de autooxidación formando homocistina (Hcy-S-S-Hcy) y/o Hcy unida a otros grupos disulfuro. En condiciones de acidificación, la Hcy forma homocisteína tiolactona (Hcy-T). Los radicales hidroxilo (OH-, OH-) y el anión superóxido (O2--), son productos generados en estas reacciones que luego se convierten en peróxido de hidrógeno (H2O2) por acción de la superóxido dismutasa (SOD). La Hcy favorece el estrés oxidativo alterando la expresión de la glutatión peroxidasa 1 (Gpx-1), una enzima antioxidante que convierte el H2O2 en aqua (H2O). Margen inferior. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas por la Hcy alteran la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) ya que: 1. Disminuyen los cofactores esenciales de las sintasas del óxido nítrico (NOS) como la tetrahidrobiopterina (BH4). 2. Convierten el NO en peroxinitrito (ONOO provocando muerte celular. eNOS (sintasa endotelial del óxido nítrico); oxidación (pérdida de electrones o incremento del estado oxidativo de una molécula, átomo o ión); reducción (ganancia de electrones o disminución del estado oxidativo de una molécula, átomo o ión). H (hidrógeno); C (carbono); O (oxígeno); N (nitrógeno); R-SH (compuestos que contienen grupo sulfhidrilo (SH/tiol o thiol); S (azufre); HCI (cloruro de hidrógeno). Gráfica adaptada de: Maron BA, Loscalzo J. Annu Rev Med. 2009;60:39-54¹⁴⁵. Imagen en aguada (microfotografía de la célula del endotelio vascular) reproducida de: Badimón L. Protección Vascular. El Endotelio como Diana Terapéutica. X Reunión del Grupo de Trombosis Cardiovascular de la Sociedad Española de Cardiología. http://www.gtcv.org/.

5. El aporte de ácido fólico disminuye gradualmente la concentración de Hcy y los autoanticuerpos contra las N-Hcy-p en las personas sanas²¹⁵ (controles), a diferencia de los individuos con EC en quienes este efecto no se consigue²¹⁶. Estos hallazgos sugieren que una vez formados los antígenos (N-Hcy-p) se promueve la respuesta del anticuerpo.

Luego, el daño crónico causado a las proteínas por la N-Hcy-p no revierte fácilmente en los pacientes con EC¹⁴⁶. En las personas con EC y ACV el análisis de los autoanticuerpos contra las N-Hcy-p revelan que la autoinmunidad promovida por la Hcy es refractaria al aporte de ácido fólico en los individuos con ATS establecida^{215,216}. Por consiguiente, aunque la intervención con folatos sea beneficiosa en prevención primaria, esta medida resulta ineficaz en la prevención secundaria de las ECV^{150,161}.

Todos los mecanismos enunciados con antelación explicarían al menos en parte el fracaso de la terapia con folatos en la prevención del riesgo cardiovascular en los estudios clínicos de intervención que pretenden reducir la Hcy plasmática¹⁵⁰. Como consecuencia de estos hechos la evidencia actual no avala la terapia farmacológica con folatos en la población general^{211,212}. Según los expertos, se recomienda el aporte de folatos y de vitaminas B₆ y B₁₂ en presencia de HHcy moderada/severa, ya que esta condición promueve la ATB^{145,150}. Persiste incertidumbre respecto a la indicación del aporte de folatos en los individuos con HHcy leve/moderada. El debate alusivo al beneficio de dicha pauta en la prevención primaria y secundaria de las ECV en personas con Hcy plasmática en rango fisiológico, sigue abierto. Algunos autores¹⁵⁰ insisten en que el tratamiento con bajas dosis de folatos disminuye el riesgo cardiovascular, si bien subrayan que es improbable que los folatos (a dosis altas) logren efectos beneficiosos aditivos en individuos que presentan Hcy en rangos normales.

La HHcy en presencia del genotipo C677T MTHFR debe tratarse con 5-MTHF por vía oral, ya que este compuesto no precisa reconversión por parte de la enzima MTHFR. Los individuos con HHcy severa que no responden a las pautas adecuada de folatos requieren restricción de Met en la dieta y suplemento de cisteína. Las personas que no responden a la vitamina B₆ necesitan adicionalmente ácido fólico y vitamina B₁₂, ya que estas vitaminas son cofactores esenciales en el metabolismo de la Met. También se ha utilizado como

terapia coadyuvante los donantes de grupos metil (como la betaína, la colina y la creatina), ya que promueven la remetilación de la Hcy a Met^{145,150.}

Existe consenso en que se requieren estudios adicionales que aporten resultados más categóricos al evaluar la intervención de los folatos sobre la concentración de Hcy, y las ECV^{150,212}. Se ha subrayado la necesidad de realizar estudios clínicos a mayor escala en la población general que evalúen los efectos del tratamiento con bajas dosis de folatos en relación con el riesgo cardiovascular¹⁵⁰. Aunque no existe suficiente información que ratifique la bondad del tratamiento de la HHcy moderada frente al riesgo cardiovascular, existe anuencia general en que las estrategias que disminuyan la concentración de Hcy (causa dependiente), no son perjudiciales. Asimismo, se ha estipulado que las estrategias que favorecen la eliminación renal de Hcy, reducen la concentración de ADMA y aumenten la concentración intracelular de 5-MTHF (al optimizar el metabolismo intracelular de la Hcy) constituyen blancos terapéuticos prometedores.

10. Enfermedad vascular mediada por la homocisteína tiolactona

En el interior de las células tras un error de edición durante la síntesis protéica, cuando se selecciona equívocamente Hcy en lugar de Met, mediante ciertas aminoaciltRNA sintasas (MetRS), se genera Hcy-T¹⁴⁶ (Figura 31). La incorporación de Hcy a través de las MetRS representa un mecanismo de protección celular frente a la incorporación de aminoácidos desconocidos a las proteínas. Sin embargo, el coste metabólico de este proceso para el organismo es la síntesis de Hcy-T. Un compuesto altamente reactivo y tóxico para las células que altera la estructura y la función protéica mediante la Hcy-p¹⁷⁵. Un factor preservador en este sentido, lo constituye la mayor afinidad de las MetRS hacia la Met, que hacia la Hcy (relación 100:1).

El proceso de edición de Hcy requiere ATP. Por consiguiente, la HHcy implica un elevado coste energético, promoviendo un efecto proapoptótico de tipo oxidativo en las células.

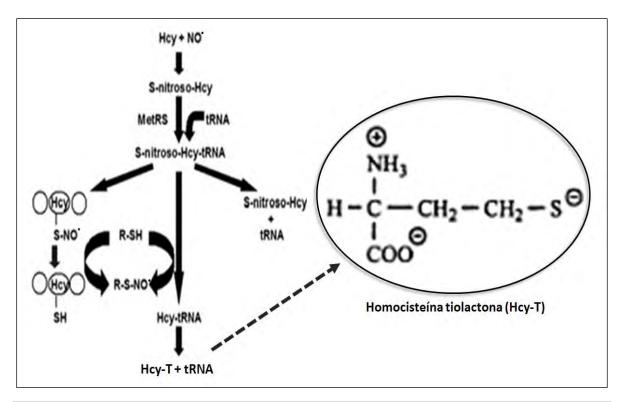


Figura 31. Incorporación de homocisteína a las proteínas. Mecanismo a través del cual la homocisteína (Hcy) se adhiere a las proteínas en los lugares usualmente ocupados por metionina (Met). NO' (óxido nítrico); MetRS (aminoacil-tRNA sintasas); tRNA (RNA de transferencia); RNA (ácido ribonucléico); R-SH (compuestos que contienen grupo sulfhidrilo (SH/tiol o *thiol*); R-S-NO' (S-nitrosotiol); S (azufre); Hcy-T (homocisteína tiolactona); H (hidrógeno); C (carbono); O (oxígeno). Modificada de: *Beltowski J. Postepy Hig Med Dosw (online). 2005;59:392-404*¹⁷⁵ y *Masella R, et al. Glutathione and sulfur amino acids in human health and disease. 2009*¹⁷⁶.

El NO' en proporciones fisiológicas neutraliza la Hcy, formando S-nitroso-homocisteína (S-nitroso-Hcy), la cual actúa sobre las plaquetas, generando una acción antitrombótica. La Hcy se involucra erróneamente durante la síntesis protéica exclusivamente si la Hcy se transforma mediante el proceso de nitrosación hacia S-nitroso-Hcy, uno de los nitrosotioles más estables del plasma. Este proceso se genera en presencia de altas concentraciones de NO' y de RNS. La S-nitroso-Hcy no se edita hacia Hcy-T. El 50% de la incorporación de Hcy a las proteínas se produce por esta vía y la otra mitad, se genera como consecuencia de la elevada reactividad de la Hcy-T^{18,19,146} (Figuras

31 y 32). La hipótesis de la Hcy-T propuesta por Jakubowski²¹⁷ en 1997, establece que la conversión de Hcy a Hcy-T favorece la toxicidad de la Hcy originando cambios proaterogénicos en el endotelio vascular. La Hcy-T es más tóxica a las células que la Hcy *per se*. El perfilamiento de las técnicas de alta sensibilidad en química e inmunohistoquímica ha permitido contrastar esta hipótesis en la fisiopatología del sistema vascular, particularmente en aquellas entidades que predisponen a la aterogénesis, como la HHcy (Figura 33).

Figura 32. Formación de homocisteína tiolactona. En el interior de las células, tras un error de edición durante la síntesis protéica, al seleccionar erróneamente homocisteína (Hcy) en lugar de Metionina (Met), mediante ciertas aminoacil-tRNA sintasas (MetRS) se genera homocisteína tiolactona (Hcy-T). Esta vía requiere de la participación de ATP (adenosintrifosfato) formando Hcy-AMP. La Hcy captada erróneamente durante la activación de los aminoácidos no se transfiere al tRNA y se transforma en Hcy-T. PPi (pirofosfato inorgánico); SH (grupo sulfhidrilo/tiol o *thiol*); AMP (monofosfato de adenosina); S (azufre); H (hidrógeno); NH₂ (grupo amino); C (carbono); O (oxígeno). Modificada de: *Jakubowski H. J Physiol Pharmacol.* 2008;59(Suppl 9):155-167¹⁴⁶.

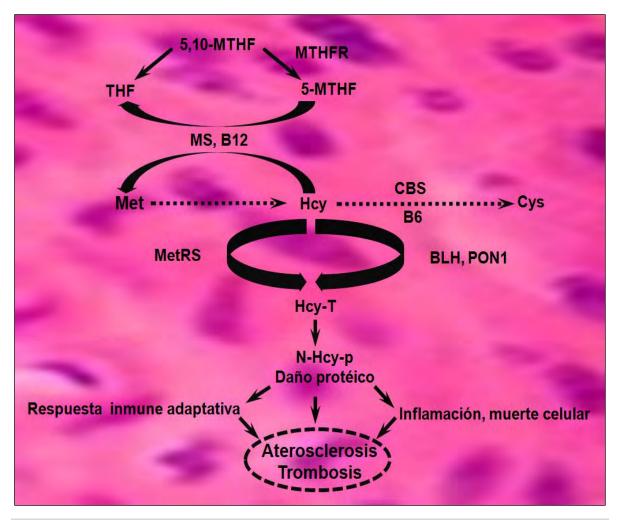


Figura 33. Hipótesis fisiopatológica de la enfermedad vascular mediada por la homocisteína tiolactona. Hcy-T (homocisteína tiolactona); 5,10-MTHF (5,10-metiltetrahidrofolato); THF (tetrahidrofolato); MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa); 5-MTHF (5-metiltetrahidrofolato); MS (metionina sintasa); B_{12} (cianocobalamina); Met (metionina); Hcy (homocisteína); CBS (cistationa β sintasa); B_6 (piridoxina); Cys (cisteína); MetRS (aminoacil-tRNA sintasas); BLH (bleomicina hidrolasa); paraoxonasa 1 (PON1); N-Hcy-p (N-homocisteinilización de las proteínas). Modificada de: Jakubowski H. J Physiol Pharmacol. 2008;59 (Suppl 9):155-167¹⁴⁶.

10.1 Homocisteinilización de las proteínas

La Hcy-p es el proceso químico mediante el cual la Hcy se une a las proteínas. Este fenómeno ha sido estudiado fundamentalmente *in vitro*. Se desconoce su relevancia en estudios *in vivo*. La Hcy-T posee un grupo de enlace SH de alta energía. Este grupo sulfidrilo le confiere gran reactividad y capacidad para alquilar o acilar diferentes aminoácidos (en especial la lisina y la cisteína) mediante el proceso de Hcy-p¹⁴⁶ (Figuras 34 y 35).

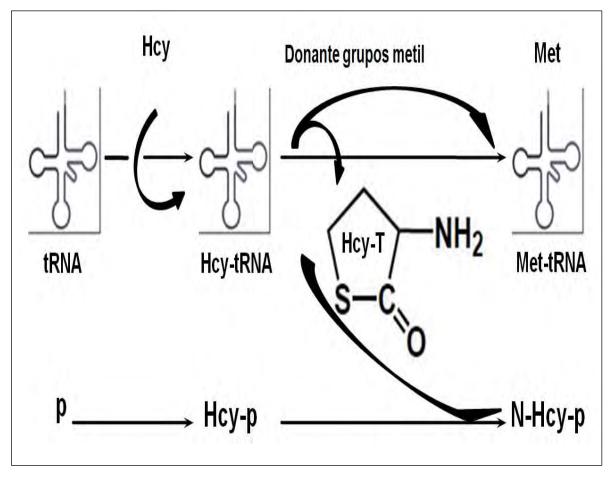


Figura 34. N-homocisteinilización de las proteínas (N-Hcy-p). La homocisteína (Hcy) se une a las proteínas (p), mediante el proceso de homocisteinilización (Hcy-p). La magnitud de la Hcy-p depende fundamentalmente de la producción de homocisteína tiolactona (Hcy-T). La hiperhomocisteinemia (HHcy) aumenta la producción de Hcy-T, mientras que la metionina (Met) la disminuye. La Hcy formada a partir del ciclo de la Met (Figura 34), se metaboliza por la vía SAM/SAH (S-adenosil-metionina/S-adenosil-homocisteína). tRNA (RNA de transferencia): ácido ribonucléico (RNA) encargado de transportar los aminoácidos a los ribosomas y ordenarlos a lo largo de la molécula del mRNA (RNA mensajero), a la cual se unen por medio de enlaces peptídicos para formar proteínas durante la síntesis protéica; NH2 (grupo amino); S (azufre); C (carbono); O (oxígeno); H (hidrógeno); N-Hcy-p (N-homocisteína unida a proteínas).

El proceso de Hcy-p se produce de diferentes modos: cuando la homocisteinilización de las proteínas se realiza a nivel de los enlaces isopeptidicos que contienen residuos de cisteína, nos referimos a la S-homocisteinilización de las proteínas. De otro lado, hacemos alusión a la N-Hcy-p, cuando dicho proceso modifica los enlaces isopeptidicos de las proteínas que contienen residuos de lisina (Figura 35). La incorporación de Hcy a las proteínas durante la Hcy-p se establece mediante puentes disulfuro en la S-Hcy-p, mientras que en la N-Hcy-p, se efectúa mediante enlaces amida (más estables).

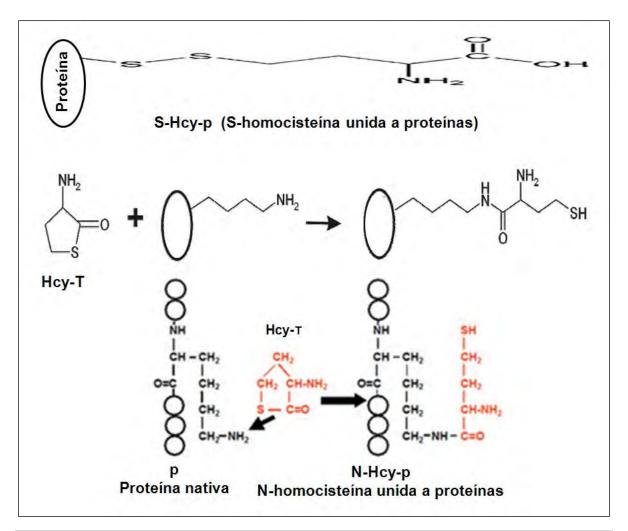


Figura 35. Estructura de las proteínas S/N homocisteiniladas. Margen superior y centro. En las proteínas S-homocisteiniladas (S-Hcy-p) el grupo sulfhidrilo (grupo SH o tiol/thiol) de la homocisteína (Hcy) se une mediante puentes disulfuro a nivel del residuo de cisteína de la proteína. En las proteínas N-homocisteiniladas (N-Hcy-p) el grupo carboxilo de la Hcy se une mediante enlaces amida a la cadena lateral del grupo amino (NH₂) a nivel del residuo de lisina de la proteína. El óvalo representa las proteínas. N (nitrógeno); H (hidrógeno); S (azufre); C (carbono); O (oxígeno); Hcy-T (homocisteína tiolactona); CH₂ (grupo funcional metileno o meteno). Modificada de: Jakubowski H. J Biol Chem. 2000;275:3957-3962²¹¹². Margen inferior. Reacción de la Hcy-T (matizada en rojo) con los grupos amino ε (NH₂), a nivel de los residuos de lisina de las proteínas. Modificada de: Bełtowski J. Postepy Hig Med Dosw (online). 2005;59:392-404¹¹⁻⁵.

10.2 Metabolismo de la homocisteína a través de la homocisteína tiolactona

La Hcy-T se genera en el interior de las células y su concentración plasmática oscila entre 0 y 35 nM, lo que representa ~0.002-0.29% de la tHcy. La Hcy-T se une a las proteínas a pH y temperatura fisiológicas. A diferencia de la eliminación de Hcy (~0.1-0.3% respecto a la creatinina), el aclaramiento renal de Hcy-T puede incrementarse ~20-700%. En estudios *in vitro* se ha demostrado que la formación de Hcy-T y de N-Hcy-p, es

directamente proporcional a la tHcy e inversamente proporcional a la concentración de Met. En la HHcy se encuentra aumento en la concentración plasmática de Hcy-T. En los humanos, tanto la Hcy-T, como la N-Hcy-p se correlacionan con la tHcy.

La alteración genética de diferentes enzimas (MTHFR, MS, CBS), el aporte insuficiente de 5-MTHF y los fármacos antifolatos, al interferir con las reacciones de remetilación y/o de transulfuración de la Hcy favorecen su metabolismo hacia Hcy-T, aumentando los niveles de Hcy-T y de N-Hcy-p. Por el contrario, el aporte de acido fólico (al reducir la relación Hcy/Met), reduce ambos compuestos. Adicionalmente, la actividad homocisteína tiolactonasa (HTasa) de la PON1, disminuye la concentración de N-Hcy-p (Figura 24). Este hecho es particularmente relevante, ya que diferentes estudios *in vitro*, sugieren que en determinadas situaciones fisiológicas la N-Hcy-p esta mediada por la conversión metabólica de la Hcy en su correspondiente lactona 146. Luego, la detoxificación de Hcy-T constituye un mecanismo vital para el organismo 218. La actividad enzimática de la hidrólisis de esta lactona es competencia de la enzima PON146. Jakubowski y cols. 20, demostraron que la actividad de la hidrólisis de la Hcy-T difiere en virtud de los polimorfismos del gen PON1. Estas variantes génicas afectan la función de la enzima PON1219, incluyendo su actividad HTasa220 (Figura 33).

Se conocen dos enzimas con capacidad para hidrolizar la Hcy-T: 1. A nivel extracelular, la actividad HTasa de la enzima PON1^{220,221}. 2. A nivel intracelular, la actividad HTasa/bleomicina hidrolasa (BLH)²²². La BLH, denominada así por su capacidad para hidrolizar la bleomicina, fue estudiada inicialmente en el contexto de la terapia antineoplásica. En los estudios *in vitro*, la actividad HTasa de la PON1 protege al organismo contra la N-Hcy-p¹⁴⁶ (Figura 33). En modelos experimentales murinos, la HHcy disminuye la expresión de la PON1. En los humanos, la HHcy altera la actividad HTasa de la PON1²²¹ y favorece el desarrollo de las ECV²²⁰⁻²²².

10.3 N-homocisteinilización de las proteínas

La N-Hcy-p se descubrió inicialmente en los fibroblastos humanos y en las células endoteliales. No obstante, se ha descrito este hallazgo en prácticamente todas las proteínas del organismo. Esta modificación postrasduccional, a más de alterar las propiedades estructurales y funcionales de las proteínas, altera la afinidad hacia sus ligandos o hacia otras proteínas. Se ha reportado en modelos murinos el fenómeno de N-Hcy-p en la HHcy y en las placas de ateroma inducidas experimentalmente. Las proteínas con dominios EGF (epidermal growth factor) en la MEC (como la fibrilina), los factores de la coagulación y los receptores LDLR, presentan mayor susceptibilidad a la homocisteinilización. Se ha evidenciado N-Hcy-p en: la apo-A1 (HDL), las LDL, la PON1 y DDAH. afectando sus actividades pleiotrópicas antiaterogénicas. las ٧ homocisteinilización de la PON1, promueve un mecanismo de retroalimentación positivo que incrementa la Hcy-T y la N-Hcy-p. De otro lado, la homocisteinilización de las DDAH, aumenta la concentración de ADMA. Diversas isoformas de las DDAH contienen entre 7-19 residuos de lisina, lo que les confiere especial vulnerabilidad a la homocisteinilización. Las Hcy-p son más propensas a la proteólisis, lo que conlleva aumento en la producción de ADMA.

La N-Hcy-p incorpora grupos SH a la estructura de la proteína generando diversas consecuencias sobre sus propiedades fisicoquímicas (Figuras 33-35):

- 1. Formación de enlaces disulfuro a nivel intramolecular e intermolecular, induciendo cambios en la estructura terciaria de las proteínas y en la agregación protéica, respectivamente.
- 2. Alteración de la carga eléctrica molecular, modificando su reactividad hacia otras proteínas o hacia sus respectivos sustratos, en el caso de las enzimas.
- 3. Daño oxidativo a la proteína, al alterar la carga eléctrica molecular. Aunque la totalidad de los grupos amino de las proteínas no se vea afectado por el proceso de

homocisteinilización, se disminuye la carga eléctrica de estos grupos, ya que los grupos amino épsilon (ϵ -NH2) de los residuos de lisina de las proteínas, poseen una pKa (logaritmo negativo de la constante de disociación-ka) más elevada (~10.5). Bajo condiciones fisiológicas, los grupos ϵ -NH2 poseen mayor carga positiva, que los grupos α -NH2 incorporados a la Hcy.

- 4. Modificación de la secuencia primaria de los aminoácidos de la proteína, alterando el plegamiento protéico en el RE y estimulando la ruta de la señalización UPR (*unfolded protein response*), promoviendo la apoptosis.
- 5. Incremento de la respuesta autoinmune (mayor producción de autoanticuerpos tipo IgG) dirigidos contra las epitopes (έ). Las epitopes son las proteínas hacia las cuales se dirigen los anticuerpos Nέ-Hcy-Lys (*N-epsilon-homocysteinyl-lysine*). Se ha reportado este hallazgo en individuos sanos. Sin embargo, en los pacientes con EC y/o AVC se encuentran títulos más elevados de estos anticuerpos que a su vez se correlacionan con la concentración plasmática de N-Hcy-p y de tHcy.
 - 6. Aumento de la respuesta inflamatoria a nivel vascular.

La N-Hcy-p representa un mecanismo biomolecular añadido al nexo existente entre las ECV de origen aterosclerótico y la HHcy (Figura 24). Aunque se ha estudiado en profundidad la bioquímica de este proceso¹⁴⁶, persisten determinados vacios al respecto. Poco se sabe acerca de: a. Los factores que regulan la síntesis de Hcy-T y su reactividad hacia las proteínas. b. La relación entre los niveles de Hcy-T y las N-Hcy-p en condiciones patológicas. c. La actividad HTasa de las enzimas PON2 y PON3. d. El proceso de N-Hcy-p a nivel intracelular *in vivo* en los humanos. Algunos investigadores creen que la N-Hcy-p acontece en el interior de las células debido a dos hechos fundamentales: en primer término la Hcy-T se genera en el interior de las células, y en segundo lugar, la actividad de la enzima PON1 es menor en el plasma que en la mayoría de los tejidos^{146,175}.

11. Paraoxonasas y aterosclerosis

Las PON (PON1, PON2 y PON3) son una familia de proteínas (hidrolasas) dependientes de calcio. El potencial antiaterogénico de las PON depende de su capacidad para hidrolizar lípidos oxidados, fosfolípidos y CEOOH, limitando su almacenamiento en las LDL⁹⁴. Las PON son básicamente lactonasas, aunque poseen actividad enzimática hacia un amplio rango de sustratos (lactosas, tiolactonas, carbonatos, ésteres y fosfotriésteres)⁸⁸. A diferencia de la PON1, las enzimas PON2 y PON3 presentan exclusivamente actividad lactonasa y antioxidante. Las PON derivan su nombre de uno de los sustratos más utilizados en la identificación de la enzima PON *in vitro*, el paraoxón; el principio activo del pesticida (Paratión), el primero y más estudiado de este tipo de compuestos organofosforados (OP), ya que éstas fosfotriesterasas rompen el enlace entre el fósforo y el oxígeno de los OP^{90,223}.

La función de la PON1 en el metabolismo lipídico, es un área de investigación relativamente reciente, ya que los esfuerzos pioneros realizados en este campo se deben en gran medida a la toxicogenómica. Inicialmente se reportó que la enzima PON1 estaba involucrada en el metabolismo de los fosfolípidos peroxidados. Desde entonces se ha generado un amplio despliegue científico hacia el conocimiento de las PON⁹⁰. Este descubrimiento ha suscitado creciente interés en la búsqueda de nuevos mecanismos moleculares implicados en el proceso aterogénico.

Los primeros estudios de la PON1 subrayaron que la acción enzimática mostraba distribución polimórfica, encontrando individuos con baja, intermedia o elevada actividad PON. A principios de la década de los 90, los estudios científicos condujeron a la identificación, clonación y secuenciamiento del gen PON1 humano y a la caracterización de sus polimorfismos. Posteriormente, se determinó la estructura molecular de la enzima PON1⁹⁰ (Figura 36).

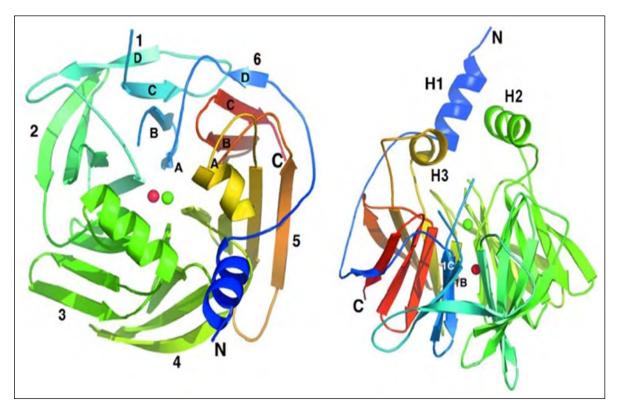


Figura 36. Estructura tridimensional de la enzima paraoxonasa 1. Izquierda. Vista frontal de la hélice β de 6 hojas (*propeller*); las terminales C y N; las 6 hojas de la hélice (1-6), cada una de las cuales está conformada por 4 hebras β (A-D) y los dos átomos de calcio localizados en el tunel central de la hélice (esferas roja y verde). Derecha. Vista lateral de la hélice β, incluyendo las 3 hélices (H1-H3) en la parte superior. El ión de calcio localizado en la parte más alta (esfera verde) y el abanico comprendido por las tres helices (H1-H3) son fundamentales para para el adecuado funcionamiento de la enzima paraoxonasa 1 (PON1). La hélice H1 (la terminal N de la PON1) y la H2 participan en el acoplamiento de la PON1 a las HDL (lipoproteínas de alta densidad). Las paraoxonasas (PON) son probablemente unas de las enzimas con mayor potencial de aprovechamiento en los próximos años. Imagen reproducida de: *Aharoni A, Tawfik DS. Directed evolution of recombinant serum paraoxonase (PON) variants. Discovery Medicine. 2004;4(21):120-124*.

Los genes de la familia PON se encuentran agrupados en el brazo largo del cromosoma 7 en los humanos (q21.22) en la secuencia PON1, PON3 y PON2, respectivamente. El gen PON1 fue el primer gen de la familia PON en identificarse. Luego se caracterizaron dos nuevos genes PON *like*: PON2 y PON3. Los genes del clúster PON presentan homología estructural considerable y provienen evolutivamente de la duplicación en tándem del mismo precursor común. Las PON (1, 2 y 3) comparten alrededor del 60% de los aminoácidos y el 70% de sus nucleótidos²²⁴. Las PON ejercen funciones ateroprotectoras, si bien se desconocen los mecanismos mediante los cuales cumplen dicho cometido. Se presume que esta acción obedece a sus propiedades

Relevancia de polimorfismos génicos y la S-homocisteína en la epigénesis en arteria mamaria interna y aorta antioxidantes, particularmente sobre las LDL⁹⁰. Aunque las PON2 y PON3 son enzimas menos estudiadas, progresivamente se les vienen atribuyendo propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. La familia PON continúa siendo objeto de renovado interés⁸⁹.

11.1 Paraoxonasa 1

11.1.1 Gen PON1

El secuenciamiento del gen PON1 ha permitido identificar cerca de 200 polimorfismos, la mayoría de los cuales aún no han sido caracterizados. Se conocen dos polimorfismos en la región codificante, cinco polimorfismos en la región del promotor y varios polimorfismos en la región no trasladada 3' del gen PON^{192,225}.

11.1.2 Polimorfismos de la región codificante del gen PON1

De las dos variantes identificadas en la región codificante, el polimorfismo glutamina 192 arginina PON1 (Gln192Arg PON1), también conocido como Q192R (rs662), es la variante genética mejor estudiada^{90,226}. Este polimorfismo altera las propiedades antioxidantes de la PON1 sobre las LDL²²⁷. El polimorfismo Q192R posee tres pares alélicos (QQ, QR y RR)²²⁸. El segundo polimorfismo de la región codificante del gen PON1, está representado por la variante Met55Leu (metionina 55 leucina), con sus correspondientes pares alélicos (MM, ML y LL). A este polimorfismo se le conoce adicionalmente como variante M55L. La sustitución de glutamina (Q/Glu) por arginina (R/Arg) en la posición 192 y de leucina (L/Leu) por metionina (M/Met) en la posición 55 de la región codificadora del gen PON1 constituyen la base molecular de la variabilidad interindividual de la PON1.

Las isoenzimas Gln192 (alelo Q) y Met55 (alelo M) del gen PON1 presentan menor actividad PON que las isoformas Arg192 (alelo R) y Leu55 (alelo L). La sustitución LM en la posición 55 ejerce menos efectos sobre la actividad PON que la sustitución QR en la posición 192. El alelo Q posee baja actividad PON y el alelo R presenta mayor actividad PON. Los individuos homocigotos QQ/MM poseen menor actividad PON a diferencia de

los homocigotos RR/LL que tienen mayor actividad PON. Las ECV son más frecuentes en los homocigotos RR que en los homocigotos QQ o en los heterocigotos. El genotipo MM se asocia a bajas concentraciones plasmáticas de la enzima PON1, mientras que los homocigotos QQ/LL están más protegidos contra la HHcv²²⁸.

Inicialmente se pensó que el polimorfismo Met55Leu PON1 afectaba la actividad catalítica de la enzima PON1. Sin embargo, Garin y cols.²¹, señalaron que el polimorfismo Met55Leu era el causante de las modificaciones en la concentración sérica de la enzima PON1, más no de su actividad catalítica. Estos autores encontraron que la homocigosis Leu55 de la variante Met55Leu constituía un FR independiente en la génesis de las ECV en pacientes diabéticos. Mackness y cols.²²⁶, reportaron que el polimorfismo Met55Leu, regulaba la concentración de la enzima PON1 con independencia del polimorfismo Q192R. Se ha descrito que este hallazgo obedece al desequilibrio de ligamiento (marcador de otra mutación en el propio gen o en otro gen cercano) en la región del promotor del gen PON1 que codifica una enzima con menor actividad PON1 en el alelo 108T del polimorfismo T108C^{229,230}. Murphy y cols.²³¹, encontraron relación entre la actividad PON del polimorfismo Met55Leu PON1 y los polimorfismos del gen de la apolipoproteína E (apoE). Además, diversos SNPs (single nucleotide polymorphisms) del gen PON1, se encuentran en desequilibrio de ligamiento con los SNPs del gen PON2⁸⁸.

11.1.3 Polimorfismos de la región del promotor del gen PON1

El secuenciamiento del promotor del gen PON1 ha permitido descubrir al menos cinco variantes en la región reguladora 5' del gen PON1, particularmente en la posición 107. Este polimorfismo contribuye aproximadamente al 22% de la variabilidad en la expresión del gen PON1 y la concentración sérica de la enzima PON1²²⁸. Si bien las variantes de la región del promotor del gen PON1 repercuten menos en la expresión de la enzima PON1, algunos estudios refieren que alteran la concentración de la PON1 en más de dos veces su estado basal^{23,229}. Estas variantes génicas se localizan en las posiciones: 909/907 (C o

G), 832/824 (A o G), 162/160 (A o G), 126 (C o G), 162 y 108/107 (C o T) del promotor del gen PON1^{230,232}. De otro lado, se ha descrito la existencia de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos de la región del promotor y la región codificante del gen PON1. Brophy y cols.²³⁰, han reportado desequilibrio de ligamiento entre la variante 107 y el polimorfismo de la región codificante R192 y su relación con la EC.

La relación existente entre los polimorfismos de la región del promotor del gen PON1 y la presencia de EC ha sido contradictoria^{91,92}. Recientemente Mackness y cols.⁹¹, reportaron que los polimorfismos de la región del promotor del gen PON1 influyen en el *status* (estado) de la enzima PON1 y que a su vez el *status* de la enzima PON1 es menor en los individuos con EC. Los autores concluyen que la disminución de la actividad PON1 (más que los polimorfismos de la región del promotor del gen) está relacionada con la EC.

11.1.4 Polimorfismos de la región codificante del gen PON1 y enfermedad coronaria

Varios estudios poblacionales han evaluado la relación entre los polimorfismos Q192R y Met55Leu del gen PON1 y la EC⁹². Sin embargo, los resultados han sido discordantes^{90,92}. La relación entre la variante Q192R del gen PON1 y la EC ha sido evaluada en extensos metaanálisis publicados antes del año 2011, no hallando asociación significativa entre el alelo 192R y la presencia de EC²³³. De forma análoga, otros dos amplios metaanálisis realizados independientemente, no encontraron relación entre la variante Q192R y EC^{234,235}. Tampoco se halló relación entre los polimorfismos Met55Leu y 108/107(C o T) PON1 y la EC en los primeros metaanálisis realizados²³⁴.

Algunos estudios epidemiológicos han señalado relación entre los polimorfismos del gen PON y el desarrollo de ECV. Regieli y cols. 126, observaron que los portadores de glutamina (alelo Q) en el codón 192 y de Met (Alelo M) en el codón 55 del gen PON1 (alelos con baja actividad PON) presentaron mayor riesgo de muerte por EC. Estos autores señalaron que las variaciones genéticas con mayor actividad PON1 influyen en el riesgo estimado a 10 años de padecer complicaciones letales por EC, lo que deja en

evidencia la relevancia de la actividad PON1 en la génesis de la enfermedad vascular. Tang y cols.²³⁶, reportaron que la disminución de la actividad sérica (arilesterasa) de la enzima PON1 permite evaluar y reclasificar el riesgo cardiovascular de padecer eventos cardiovasculares mayores (MACE/major adverse cardiovascular events): IAM, ACV o muerte

Un metaanálisis más reciente (publicado en 2012) compiló 47 estudios (9853 individuos con EC y 11.408 controles) hallando relación entre la disminución de la actividad PON1 y el riesgo de padecer EC²³⁷. Otro meta análisis (que incluyó 43 estudios y 20.629 enfermos) publicado el mismo año mostró resultados análogos²³⁸. En sendos metaanálisis, se evidenció incremento del riesgo de EC en los individuos con menor actividad PON1 con independencia de la edad y del grupo étnico^{237,238}. En la tabla 9 se resumen los hallazgos de los estudios de la enzima PON1 y su nexo con las ECV.

Tabla 9. PON1 humana y su relación con las enfermedades cardiovasculares

La disminución de la actividad de la enzima PON1 se relaciona con el riesgo de padecer enfermedad coronaria

Algunos estudios evidencian que la presencia del alelo R del polimorfismo Gln192Arg PON1 incrementa el riesgo de padecer aterosclerosis y enfermedad coronaria

No existe certeza acerca de la correlación entre los polimorfismos M55L y 108/107 PON1 (C o T) y la enfermedad coronaria, ya que los resultados de los estudios son inconsistentes

El alelo 192R PON1 incrementa discretamente el riego de presentar ACV

No hay evidencia suficiente que relacione el polimorfismo M55L PON1 y el riesgo de presentar ACV

PON1 (paraoxonasa 1); enfermedades cardiovasculares (ECV); R (arginina); M (metionina); L (leucina); 55 leucina); C (citosina); T (timina); ACV (accidente cerebrovascular). Modificada de: Litvinov D, et al. Am J Med Sci. 2012;4(11):523-532⁹².

Se ha sugerido que la incongruencia encontrada en los resultados de los estudios de la enzima PON1 obedece a: 1. Escaso número de pacientes de diferentes poblaciones y/o falta de estandarización de la metodología. 2. Diversidad de los sustratos empleados en la determinación enzimática de la PON. 3. Diferencias en los métodos empleados en la genotipación, lo cual dificulta la interpretación de los resultados.

Pese a la versatilidad de los resultados de los estudios de la PON1 se ha insistido en que la diferencia individual entre la actividad y la concentración de la enzima PON1 desempeña una función relevante en su protección frente a la EC.

Se han propuesto diversos métodos para optimizar el estudio de la PON1²⁴⁰: 1. Se aduce que la información que proporciona el haplotipo clarificaría la influencia genética de la actividad de la PON1. 2. La bioinformática de alto rendimiento ha permitido reconstruir los haplotipos y estimar su frecuencia en poblaciones no relacionadas entre sí, basándose en la información que proporcionan los SNPs. 3. Se ha estimado la máxima probabilidad de la ocurrencia de un evento mediante el algoritmo Bayesiano. Este algoritmo es el método más ampliamente difundido hacia la aproximación en la inferencia de los haplotipos. 4. El Phase (software for haplotype reconstruction, and recombination rate estimation from population data) y el tagging SNPs (tagSNPs), son dos programas bioinformáticos desarrollados para inferir los haplotipos de los cinco SNPs más comunes del gen PON1 y evaluar su asociación con la actividad de la enzima PON1. Estos programas estadísticos minimizan la probabilidad de error en la reconstrucción de los haplotipos. 5. Se ha subrayado la relevancia de la estimación conjunta de los factores que regulan tanto la actividad, como la concentración de la enzima PON1. El denominado status de la enzima PON1²³⁹.

11.1.5 Actividad de la enzima PON1

La PON1 [EC 3.1.1.2] es una glucoproteína de síntesis esencialmente hepática, aunque se encuentra ampliamente distribuida en otros órganos como el riñón y el intestino⁹⁰. La secuencia de sus aminoácidos es indispensable para lograr su acoplamiento a las HDL²⁴¹. La PON1 se transporta acoplada a las HDL, especialmente a una subclase de HDL que transporta apoA-I^{241, 242}. La actividad de la PON1 se consolida en presencia de la apoA-1 estimulando selectivamente la actividad lipolactonasa²⁴³. La disminución de las HDL y de la apoA-I estan relacionadas con menor actividad PON1²⁴⁴. Experimentalmente la apoA-I capta los hidroperóxidos de las LDL e inhibe la respuesta inflamatoria responsable de la formación de la estría grasa y de las lesiones ateroscleróticas^{70,71}. La

actividad antioxidante de las HDL se realiza en gran medida merced a la enzima PON1^{21,245}.

Clásicamente se ha descrito la PON1 como una enzima paraoxonasa/arilesterasa²⁴⁶, aunque la PON1 es en realidad una lactonasa, siendo las lactonas lipofilicas su esencia primaria⁸⁸. La PON1 hidroliza tiolactonas como la Hcy-T²⁰.

La PON1 favorece las propiedades antioxidantes de las HDL, ya que: 1. Disminuye la oxidación de las LDL^{227,247} y de los ésteres de colesterol peroxidados mediante la hidrólisis de los fosfolípidos. 2. Reduce la acumulación de las LDL en la pared de los vasos sanguíneos. 3. Incrementa la movilización del colesterol por parte de los macrófagos, a través de la actividad quimiotáctica de los monocitos. 4. Destruye las moléculas proinflamatorias involucradas en la aterogénesis^{248,249}. 5. Metaboliza algunos lípidos oxidados, derivados del ácido araquidónico y del ácido decosahexanoico (Figura 37).

A más de las evidencias precedentes, el nexo más convincente entre la actividad PON1 y la EC proviene de los estudios realizados en ratones trasgénicos²⁵⁰⁻²⁵²: 1. Los ratones KO PON1-/- sometidos a dietas aterogénicas desarrollan ATS. 2. El ratón DKO apoE/PON1-/- presenta ATS más severa que el ratón apoE-/-. Este hallazgo señala que la PON1 protege contra la aterogénesis²⁵¹. 3. El aumento de la expresión del gen PON1 protege frente la ATS, tanto en el ratón silvestre, como en el ratón ApoE-/-²⁵².

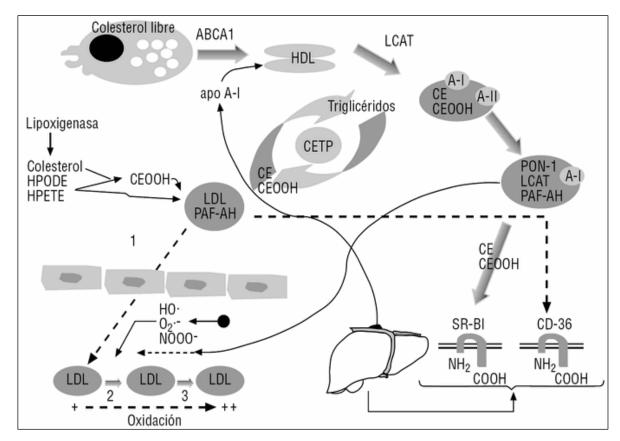


Figura 37. Metabolismo de las HDL, función protectora frente a la oxidación de las LDL e interrelación con la enzima PON1. El potencial antiaterogénico de la enzima paraoxonasa 1(PON1) está dado por su capacidad para hidrolizar lípidos oxidados, fosfolípidos y ésteres de colesterol peroxidados (CEOOH),limitando su acopio en las lipoproteínas de baja densidad (LDL)⁹⁴. Navab y cols.⁷⁰, presentaron evidencia experimental del mecanismo de sembrado (*seeding*) de las LDL. Se presume que la PON1 interfiere en el proceso de *seeding* de las LDL (la primera de las tres fases implicadas en la oxidación de las LDL)⁷⁰. La actividad de la enzima PON1 se restringe a una subclase de lipoproteínas de alta densidad (HDL) que transporta apolipoproteína A-1 (apoA-I)²⁴². A su vez las HDL requieren de apoA-I para lograr estabilidad enzimática²⁴³. El gen *CLA-1* (*CD36 and Lysosomal integral membrana protein-II analogous-1/ LIMP II analogous-1)*, es el homólogo humano del gen *SR-B1* (*Scavenger Receptor class B type 1*) y constituye el primer receptor de alta afinidad de las HDL bien caracterizado. El receptor CLA-1 participa en el transporte inverso de colesterol (TRC) mediante la entrada selectiva de ésteres de colesterol (CE) nativos y oxidados. En los humanos, el gen *CLA-1* es polimórfico y algunas de sus variantes se asocian a cambios fenotípicos en las lipoproteínas plasmáticas. Ambos genes participan en el complejo metabolismo de las HDL y en los mecanismos de defensa antioxidantes⁷². El TRC se refleja con mayor detalle en la figura 23⁵². PAF-AH (acetilhidrolasa del factor activador de las plaquetas); PAF (factor activador de plaquetas); CEOH (hidróxidos de ésteres de colesterol); HPODE (ácido 13-hidroperoxioctadecadienoico); HPETE (ácido hidroperoxiecosatetraenoico); COOH (ácido carboxílico). Reproducida de: *Rodríguez F, et al. Rev Esp Cardiol. 2006;59:154-64*⁷⁰.

11.1.6 Determinantes de la expresión del gen PON1

Existe amplia variación individual y racial en la concentración y la actividad de la enzima PON1 en los humanos. Esto sucede igualmente entre las personas de un mismo genotipo. Pese a ello, ambos parámetros permanecen relativamente constantes en cada

persona a lo largo de la vida²²³. Concurren varios factores de transcripción y diferentes vías que regulan la expresión del gen PON1⁹² (Figura 38).

Algunas diferencias en la actividad y la concentración de la enzima PON1 son atribuibles a los polimorfismos en la región codificadora del gen PON1 (Q192R y Met55L). La variabilidad en la concentración de la PON1 obedece adicionalmente, al menos en parte, a las variantes en la región reguladora 5' del promotor del gen PON1 (T-108). Además de los polimorfismos génicos, la actividad PON1 se modifica como consecuencia de otros determinantes no genéticos (aún no identificados) los cuales contribuyen a explicar las diferencias individuales observadas en el estado de la enzima PON1 en las personas con alto riesgo de padecer EC, previenen o retardan el inicio de la EC91.

Tabla 10. Factores que determinan la expresión de la enzima paraoxonasa 190,92

Determinantes genéticos

Polimorfismos de la región codificante del gen PON1: Gln192Arg y Met55Leu

Polimorfismos de la región reguladora 5' del promotor del gen PON1: 909/907, 832/824, 126, 162 y 108/107

Determinantes no genéticos asociados a disminución de la actividad de la enzima PON1

Dieta proaterogénica⁽¹⁾

Hábitos de vida: tabaquismo⁽²⁾

Envejecimiento⁽³⁾

Procesos patológicos: obesidad y síndrome metabólico, hipertensión arterial, diabetes mellitus, nefropatía diabética, cirrosis hepática de origen etílico, hepatitis C, infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida, alteraciones neurológicas (esclerosis lateral amiotrófica), estados de ansiedad, insuficiencia renal crónica, enfermedad carotidea, preeclampsia, "Síndrome de la Guerra del Golfo"

Determinantes no genéticos asociados a incremento de la actividad de la PON1

Dieta cardiosaludable: ácido oleico, aceite de oliva, vitaminas antioxidantes (C y E), polifenoles⁽⁴⁾

Agentes farmacológicos: estatinas, fenofibratos, polifenoles dietéticos 4 (resveratrol, quercetin)

Ingesta moderada de alcohol⁽⁵⁾

Ácido acetil salicílico (ASA) y los productos derivados de la hidrólisis del ASA (salicilatos)

Factores aún no identificados

Trans-acting factors y algunas variantes exónicas e intrónicas en el secuenciamiento de las bases de los nucleótidos en la región reguladora 5' y 3' del gen PON1

PON1 (paraoxonasa 1); (1) Se asocia a disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL); (2) Disminuye la concentración y la actividad de la PON1; (3) El polimorfismo Q192R PON1 parece ser determinante de la perdida de la actividad enzimática durante el proceso de envejecimiento. Los homocigotos QQ desarrollan perdida adicional de la actividad PON1 en este proceso; (4) Los polifenoles además de aumentar la expresión del gen PON1 y la actividad de la PON1 poseen actividad antioxidante y antiinflamatoria, disminuyendo los triglicéridos y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) in vivo; (5) Incrementa la concentración y actividad de la PON1, las HDL y la apolipoproteína A1 (apo-A1).

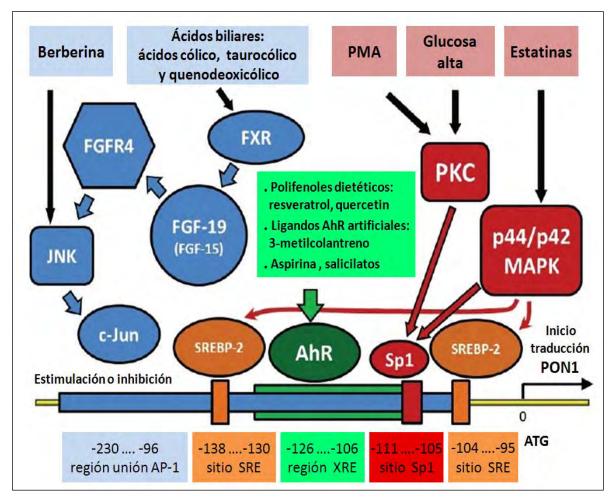


Figura 38. Determinantes de la regulación transcripcional del gen PON1. Los procesos reflejados en la gráfica acontecen en el hígado, aunque se presume que en el íleon los ácidos biliares estimulan la síntesis del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF-19 en los humanos y FGF-15 en los ratones). El PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) y la hiperglicemia estimulan el factor de transcripción Sp1 (Spcificity Protein 1) a través de la PKC (protein kinase C) y de la MAPK (p44/p42 mitogen-activated protein kinase). Las estatinas favorecen la transcripción del gen PON1 al activar el factor Sp1. Las estatinas además estimulan la MAPK y el SREBP-2 (sterol regulatory element binding protein 2) aumentando la transcripción del gen PON1. Los polifenoles, la aspirina y los ligandos artificiales del receptor AhR (aryl hydrocarbon receptor) activan el AhR y la transcripción del gen PON1. El c-Jun es otro factor de transcripción involucrado en la expresión del gen PON1. La acción del c-Jun está regulada por la JNK (c-Jun N-terminal kinase). Asimismo, la berberina (benzyl tetrahydroxyquinoline), un alcaloide que reduce el colesterol, activa la JNK y el c-Jun, favoreciendo la transcripción del gen PON1 en las células hepáticas. Sin embargo, la activación de la vía JNK/c-Jun por parte de los ácidos biliares, ejerce el efecto contrario, suprimiendo la expresión del gen PON1 en el hígado. La activación del receptor FXR (farnesoid X receptor) por los ácidos biliares, promueve la expresión de FGF-19 y FGF-15, inhibiendo la expresión del gen PON1. El factor del crecimiento estimula el FGFR4 (fibroblast growth factor receptor 4), con la consecuente activación de la JNK, además de la fosforilación del c-Jun. Contrariamente a lo que sucede con el estímulo del c-Jun por la berberina, la vía FXR/FGF-19/FGFR4/JNK/c-Jun, inhibe la transcripción del gen PON1. Tanto el FXR, como el FGFR4 son indispensables en esta vía transcripcional. El c-jun es un gen que codifica la proteína c-Jun, la cual, tras combinarse con la proteína c-Fos, conforma el factor de transcripción AP-1. Su activación se produce mediante doble fosforilación a través de la ruta JNK, aunque también se ha descrito una función alternativa independiente de la fosforilación. Se ha podido comprobar que el modelo knockout de c-jun es letal, a diferencia de los animales transgénicos cuyo gen c-jun había sido mutado para evitar la fosforilación de la proteína c-Jun (c-JunAA). La proteína c-Jun reconoce de un modo directo secuencias específicas del DNA para regular su expresión. El gen c-jun no posee intrones y se encuentra en una región cromosómica implicada en procesos de traslocaciones y deleciones en diversas patologías humanas. Adaptada de: Litvinov D, et al. Am J Med Sci. 2012;4(11):523-53292

11.2 Paraoxonasa 2

11.2.1 Gen PON2

El gen PON2 es el segundo miembro del clúster PON.

11.2.2 Polimorfismos del gen PON2

Se han identificado dos polimorfismos del gen PON2: glicina 148 alanina (Gly148Ala/G148A) y cisteína 311 serina (Cys311Ser/C311S). A este último polimorfismo también se le denomina variante Ser311Ser PON2 [rs7493]²⁵³. La variante en la posición 148 (G148A) se asocia a: concentración de colesterol; niveles de glicemia; nefropatía en pacientes con DM tipo 2 y peso al momento del nacimiento. Estos hallazgos sugieren que dicho polimorfismo se relaciona con una importante actividad metabólica²⁵⁴. De otro lado, la variante Cys311Ser se relaciona con: engrosamiento de la pared arterial; retinopatía diabética; DM tipo 2; ACV e hipercolesterolemia familiar heterocigótica²⁵⁵.

11.2.3 Actividad de la enzima PON2

El análisis de la enzima PON2 es más complejo, ya que a diferencia de las enzimas PON1 y PON3 (las cuales se encuentra acopladas en el plasma a las HDL), la PON2 ejerce su actividad antioxidante exclusivamente a nivel intracelular²⁵⁶. Existe poca información disponible referente a la enzima PON2. Los análisis filogenéticos sugieren que la PON2 es la enzima más antigua, además de poseer la mayor actividad lactonasa de los miembros de la familia PON. El mRNA (RNA mensajero) de la PON2 se expresa de forma ubicua en los tejidos de los mamíferos, aunque su expresión es predominantemente testicular, placentaria, hepática, pulmonar y cardíaca. Se desconoce la acción fisiológica de la enzima PON2²⁵⁵, aunque se expresa en las células endoteliales y en las VSMC de la aorta en los humanos²⁵⁷. Se vienen atribuyendo diferentes propiedades antiaterogénicas a la PON2: 1. Disminución del estrés oxidativo y de la oxidación de las LDL (al igual que la PON1 y la PON3). 2. Reducción del depósito de triglicéridos en los macrófagos. 3. Disminución de la quimiotaxis sobre los monocitos. 4. Protección frente a la apoptosis

11.2.4 Polimorfismos del gen PON2 y enfermedad coronaria

Pocos trabajos hacen alusión a los polimorfismos del gen PON2 y la EC. Se ha relacionado el polimorfismo Cys311Ser y la EC en algunos estudios²⁵⁸. Martinelli y cols.²⁵⁹, reportaron esta asociación exclusivamente en fumadores. Leus y cols.²⁵⁵, encontraron que los portadores del alelo Ser311 PON2 presentaron mayor riesgo de padecer EC, mientras que la homocigosis Cys/Cys 311 ejerció un efecto protector contra la EC. Shanguera y cols.²⁶⁰, señalaron que el alelo Ser 311 incrementó el riesgo de EC en una población Hindú. Su y cols.²⁶¹, reportaron efecto sinérgico entre los polimorfismos 107CT PON1 y Cys311Ser PON2 en un subgrupo de mujeres chinas que presentaba mayor prevalencia de EC. Marchegiani y cols.²⁶², investigaron la relación existente entre el polimorfismo Cys311Ser PON2 y el pronóstico de IAM en pacientes de la tercera edad. Estos investigadores concluyeron que los portadores del alelo Cys constituyen un subgrupo con mayor riesgo de padecer IAM de peor pronóstico, recomendando un seguimiento más estrecho de esta cohorte. Los estudios mencionados con antelación reflejan que los polimorfismos en el codón 311 del gen PON2 incrementan el riesgo de presentar EC y que dicho riesgo difiere entre los subgrupos poblacionales²⁶³.

11.3 Paraoxonasa 3

11.3.1 Gen PON3

Disponemos de poca información acerca de este miembro recientemente clonado de la familia PON²⁶⁴. El gen PON3 se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 7, en el clúster PON, entre los genes PON1 y PON2²⁶⁵.

11.3.2 Actividad de la enzima PON3

La PON3 es la enzima menos conocida de la familia PON. La PON3 se sintetiza en el hígado y al igual que la PON1 se encuentra acoplada a las HDL en los humanos²⁶⁵. La

actividad lactonasa de la PON3 se consolida mediante su incorporación a la apo-A1 de las HDL de forma análoga a como sucede con la PON1^{265,266}. A diferencia de la PON1, la PON3 posee escasa actividad arilesterasa y no hidroliza el paraoxón, ni el fenilacetato. Sin embargo, hidroliza rápidamente diversas lactonas, como aquellas incorporadas a ciertas prodrogas (estatinas, espironolactona)²⁶⁵.

La escasa evidencia disponible de las propiedades antiateromatosas de la PON3 se deriva de los trabajos experimentales^{267,268}. 1. En los cerdos, la PON3 se expresa ubicuamente, aunque de forma predominante en el tejido graso perirenal y subcutáneo de los animales obesos. Estos hallazgos señalan su implicación en la fisiopatogenia de las enfermedades relacionadas con la obesidad. 2. En los ratones transgénicos, la PON3 disminuye la obesidad y previene contra la aterogénesis. 3. En los ratones KO apoE-/-, los efectos ateroprotectores de las PON humanas (1 y 3) son similares, aunque difieren sus mecanismos antiaterogénicos. 4. El aporte exógeno de PON3 en los cultivos de células endoteliales de aorta humana disminuye la oxidación de las LDL. 5. La PON3 además de presentar propiedades similares a la enzima PON1 (aunque con menores propiedades antiaterogénicas) desempeña una actividad ateroprotectora más estable, a diferencia del efecto ateroprotector que se atribuye a la PON1, el cual es más variable.

11.4 Paraoxonasas, género y enfermedad coronaria

La mayoría de estudios sobre las PON no han estimado la diferencia por género o han tenido mayor participación de hombres. Luego, es escasa la información alusiva a los polimorfismos de los genes PON y su correspondencia con el género y la presencia de EC²⁶⁹. Su y cols.²⁶¹, evaluaron el gen PON1 y su relación con la EC en una población china de etnia Han (mujeres blancas, afroamericanas y chinas), encontrando correlación entre los polimorfismos 107CT PON1, Cys311Ser PON2 y EC en este subgrupo de mujeres. La interrelación genotipo/fenotipo mostró que la baja expresión de la enzima PON1 determinada por la presencia del alelo 107T incrementó el riesgo de padecer EC. El

y Cys311Ser PON2.

11.5 Paraoxonasas y su actividad durante el proceso de envejecimiento

Fisiológicamente, los neonatos presentan menor actividad PON1 que los adultos²⁷⁰, alcanzando la actividad PON de la población adulta entre los 6 y los 24 meses de edad²⁷¹. El polimorfismo Q192R PON1 constituye el principal determinante de la enzima PON1 antes de la pubertad, encontrándose en esta edad alrededor del 70% de la actividad PON1. En las mujeres, las HDL aportan un pequeño efecto aditivo a la acción de la PON1²⁷². Los efectos protectores de la PON1 disminuyen considerablemente a lo largo de la vida y durante la menopausia, encontrándose menor actividad PON1 en las personas mayores (cuando se la compara con la población joven) favoreciendo el proceso ateroesclerótico en la senectud. Esta menor capacidad antioxidante de las HDL (asociada al proceso de envejecimiento) obedece a la modificación de los grupos sulfhidrilo libres de la enzima PON1^{271,273}.

Algunos autores no han encontrado correlación entre los diferentes polimorfismos del gen PON1 y el desarrollo de eventos cardiovasculares mortales en la tercera edad. Sin embargo, se ha reportado relación entre la variante 192 PON1, la edad y el riesgo de padecer IAM. Este hecho obedece a que la actividad PON1 disminuye progresivamente en función de la edad en los homocigotos para el alelo Q. Por consiguiente, el riesgo de IAM es mayor en los pacientes de la tercera edad, fundamentalmente en los portadores del genotipo QQ (menor actividad PON1)^{270,271}.

En los estudios de longevidad de la población en humanos, los investigadores han centrado su interés en la expresión del gen PON1. Los individuos longevos presentan menor prevalencia de alelos de riesgo (192Q PON1 y 107T PON1) y mayor prevalencia de genotipos ateroprotectores (107CC), los cuales favorecen la actividad de la enzima PON1 y de las HDL²⁷⁴. Marchegiani y cols.²⁶², reportaron que el locus PON1 modula la actividad

PON durante toda la vida de los seres humanos (incluyendo los nonagenarios y centenarios), influyendo en la expectativa de vida de cada persona. La concentración de la enzima PON1 varía entre los portadores de los alelos R y M. Por ende, los alelos R+ y M-, contribuyen a definir el fenotipo de la longevidad.

12. Dimetilarginina asimétrica como factor de riesgo cardiovascular

En 1992, Vallance y cols.²⁷⁵, reportaron que la ADMA se acumulaba en el plasma de los pacientes con IRC terminal en concentración suficiente para inhibir las NOS. Este hallazgo permitió inferir que la ADMA alteraba la función endotelial y la inmunidad de los pacientes con IRC terminal. Estos investigadores encontraron que la ADMA producía vasoconstricción dosis dependiente en ratas y en humanos. Desde entonces, existe creciente interés en el estudio de los factores que regulan la ADMA^{177,276}.

En condiciones fisiológicas, las proteínas están sujetas al proceso de metilación de los residuos de arginina por intermedio de las PRMT. La ADMA es un aminoácido metilado endógeno (análogo a la L-arginina) que inhibe la eNOS, la nNOS y en menor medida la iNOS (Figura 39). La ADMA actúa como inhibidor endógeno de la eNOS por inhibición competitiva de la L-arginina. La ADMA se produce en todas las células del organismo (mediante la hidrólisis de las proteínas), alcanza el plasma acoplada a una familia de aminoácidos catiónicos (CAT) y se metaboliza (a nivel intracelular) en el riñón y en el hígado, a través de las DDAH.

Las DDAH degradan la ADMA reduciendo su concentración plasmática, contribuyendo así a mejorar la biodisponibilidad de NO' y conservar la homeostasia cardiovascular y renal. La concentración intracelular de ADMA es extremadamente sensible a los cambios en la expresión de las DDAH. No obstante, en los modelos murinos de experimentación, la supresión del gen DDAH2 altera la respuesta vasodilatadora del endotelio mediada por el NO' (EDRF/NO') sin modificar la concentración plasmática de

ADMA, ya que esta se acumula en el interior de las células en cantidad suficiente para inhibir la producción de NO, sin que se incremente la concentración plasmática de ADMA¹⁷⁷.

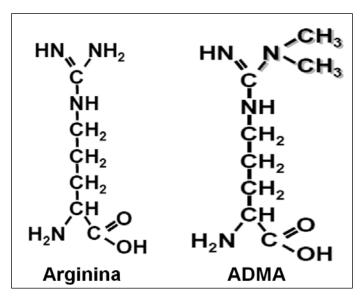


Figura 39. Fórmulas químicas de la arginina y la dimetilarginina asimétrica. Arg (arginina); ADMA (dimetilarginina asimétrica). H (hidrógeno); N (nitrógeno); C (carbono); NH₂ (grupo amino); O (oxígeno); CH₃ (grupo metil).

12.1 ADMA, DDAH y enfermedad cardiovascular

La disminución de la actividad y/o de la expresión de las DDAH es un mediador de las ECV y renales asociadas a la ANG II, al estrés oxidativo, a la respuesta inflamatoria y a la resistencia a la insulina. En consecuencia, se ha propuesto la ADMA como predictor del riesgo cardiovascular. Con todo ello, algunos investigadores han confirmado estos hallazgos exclusivamente en ciertos subgrupos de pacientes (HHcy, tabaquismo e IRC)^{177,277}.

Se ha descrito aumento en la concentración plasmática de ADMA en diferentes patologías y en individuos que portan diversos FRECV (Tabla 11). Adicionalmente, en algunas patologías asociadas al riesgo cardiovascular se ha descrito relación entre el incremento de ADMA y cambios en la expresión del gen DDAH¹⁷⁷.

Tabla 11. Entidades y factores de riesgo cardiovascular relacionados con incremento de ADMA¹⁷⁷

Entidades relacionadas con aumento de ADMA

Aterosclerosis

Enfermedad arterial periférica

Remodelamiento de la arteria carótida

Enfermedad coronaria

Hipertrofia ventricular izquierda

Insuficiencia renal crónica

Proceso de envejecimiento

Posmenopausia

Factores de riesgo cardiovascular relacionados con aumento de ADMA

Dislipemia: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e incremento de las LDL

Tabaquismo*

Hiperhomocisteinemia

Aumento de la proteína C reactiva

ADMA (dimelilarginina asimétrica); LDL (lipoproteínas de baja densidad); *Adicionalmente, en los fumadores se ha reportado: 1. Disminución de la expresión de la sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS). 2. Disminución de la expresión del gen de la enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2 (DDAH2). 3. Menor actividad de las células endoteliales. 4. Disminución de la angiogénesis.

Aunque numerosos reportes clínicos correlacionan la ADMA y la función endotelial, poco sabemos acerca de la interacción entre la ADMA y el NO en los vasos sanguíneos. La ADMA altera las vías transcripcionales de la señalización *redox*, al incrementar la producción de superóxidos, contribuyendo a la aterogénesis.

Paulatinamente se viene reconociendo la trascendencia de la ADMA como marcador del riesgo cardiovascular. No obstante, se desconoce si la ADMA constituye exclusivamente un marcador biológico del riesgo cardiovascular o si además se encuentra involucrada en la etiopatogenia de las ECV ateroscleróticas.

Los resultados de Antoniades y cols.²⁰⁸, muestran relación directa entre la ADMA y los determinantes de la función vascular, como el incremento de superóxidos en los vasos sanguíneos. La interacción entre la vía NOS/DDAH y las rutas metabólicas que generan ROS, revelan que tanto las ROS como la ADMA alteran la función del endotelio vascular^{177,208} (Figura 40).

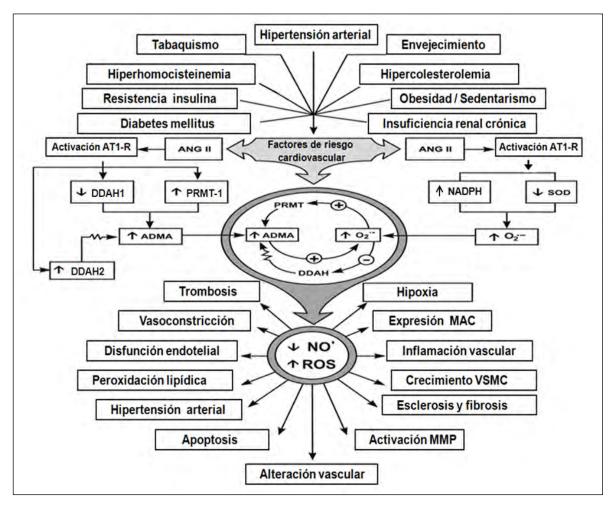


Figura 40. ADMA, especies reactivas de oxígeno y su relación con los factores de riesgo cardiovascular. Cambios fisiopatológicos tisulares que subyacen a las enfermedades cardiovasculares y renales. AT1-R (Receptor tipo 1 de la angiotensina II); ANG II (angiotensina II); DDAH (dimetilarginina dimetilaminohidrolasas 1 y 2); PRMT (*Protein arginine N-methyltransferase*); ADMA (dimetilarginina asimétrica); O2⁻⁻ (anión superóxido); NO (óxido nítrico; ROS (especies reactivas de oxígeno); NADPH oxidasa (fosfato nicotinamida adenina dinucleótido oxidasa); SOD (superóxido dismutasa); MAC (moléculas de adhesión celular); VSMC (células del musculo liso vascular); MMP (metaloproteinasas de la matriz extracelular); VSMC (células del músculo liso vascular). Adaptada de: *Palm F, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007:293:H3227-H3245¹⁷⁷.

12.2 Gen DDAH

El gen DDAH1 se localiza en el cromosoma 1p22 y el gen DDAH2 en la región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) III del cromosoma 6p21.3. Estas regiones del cromosoma contienen clústeres de genes homólogos, por lo que se presume que la duplicación del gen DDAH ocurrió cuando los *clústeres* aparecieron en el genoma de los homínidos hace ~450 millones de años. El hecho de que el gen DDAH se hubiese

conservado a lo largo del proceso evolutivo, sugiere que la enzima DDAH confiere una valiosa ventaja en la supervivencia^{24,177}.

12.3 Tejidos de expresión y actividad de las DDAH

Las DDAH se expresan en las regiones en las que se expresan las NOS. La DDAH1 se expresa principalmente en el riñón. La DDAH2 se expresa predominantemente en los tejidos de expresión de la eNOS (células del endotelio vascular)¹⁷⁷, en el corazón y de forma minoritaria en el riñón^{25,177}. La DDAH2 se expresa adicionalmente en los tejidos inmunológicos que expresan la iNOS (bazo, timo, leucocitos periféricos, ganglios linfáticos y médula ósea). Existe control diferenciado entre las DDAH y los receptores tipo 1 (AT1-R) de la angiotensina II (ANG II). En el riñón, el receptor AT1-R disminuye la expresión de la DDAH1, pero incrementa la expresión de la DDAH2. Esta distribución y expresión específica de las DDAH en el riñón y en los vasos sanguíneos, constituyen mecanismos reguladores de la biodisponibilidad del NO¹ y de la conservación de la función cardiovascular y renal. Las DDAH ejercen sus funciones mediante dos mecanismos: 1. Hidrólisis de la ADMA hacia citrulina, dimetilamina o monometilamina. 2. Interacción proteína-proteína (regulando la transcripción génica)¹⁷⁷ (Figura 41).

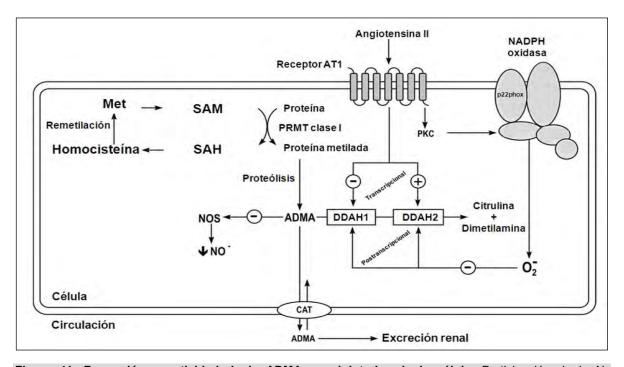


Figura 41. Formación y actividad de la ADMA en el interior de la célula. Participación de la N-metiltransferasa de la L-arginina (PRMT) en la formación de la dimetilarginina asimétrica (ADMA) y de esta en la disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO⁻), como consecuencia de la alteración de la actividad de las NOS. Se refleja la degradación enzimática de la ADMA por parte de las dimetilarginina dimetilaminohidrolasas 1 y 2 (DDAH1 y DDAH2) y el transporte de la ADMA desde el interior de las células hacia el torrente sanguíneo por los aminoácidos catiónicos (CAT). Se detalla la interacción entre las DDAH y la angiotensina II (ANG II) y su acción sobre los receptores tipo 1 de la angiotensina (AT1-R), los cuales a su vez activan la proteína cinasa C (PKC). Además se ilustra el efecto del anión superóxido (02⁻) generado por la NADPH oxidasa y el incremento del estrés oxidativo inducido por la hiperhomocisteinemia (HHcy). Met (metionina); SAM (S-adenosil-metionina); SAH (S-adenosil-homocisteína); NOS (sintasas del NO⁻); NADPH oxidasa (fosfato nicotinamida adenina dinucleótido oxidasa); p22phox (*critical component of the superoxidegenerating NADH/NADPH oxidase system*). Adaptada de: *Palm F, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H3227-H3245¹⁷⁷.

12.4 Actividad y expresión de las DDAH en los vasos sanguíneos

La DDAH2 se expresa en las células endoteliales y en las VSMC. La DDAH2 regula la expresión de la iNOS en las VSMC a través del metabolismo de la ADMA al estimular la IL-1β. La IL-1β a su vez incrementa la expresión del gen DDAH y la actividad enzimática de las DDAH.

Las DDAH regulan la producción de NO' mediante las citocinas y protegen el endotelio contra la injuria vascular de la iNOS que acontece en la ATS. Adicionalmente, las DDAH participan en diferentes procesos biológicos como la reparación del endotelio vascular y la angiogénesis.

12.5 Expresión del gen DDAH

El gen DDAH modula la expresión de un amplio rango de genes subsidiarios, además de regular la concentración de ADMA y la producción de NO' en las células endoteliales. La inactivación y/o la delección del gen DDAH en modelos murinos ha permitido estudiar el gen DDAH y saber que: 1. Regula la concentración de ADMA. 2. Es indispensable en la actividad de los vasos de resistencia mediados por el NO' (EDRF/NO'). 3. Regula la expresión de los genes involucrados en la angiogénesis. 4. La ADMA activa la vía RhoA (the Ras homolog gene family member A) y Rho cinasa (the Ras homolog gene family) en las células endoteliales, alterando la angiogénesis. 5. La ADMA actúa como inhibidor endógeno de la angiogénesis, alterando la vía NOS/NO'.

Las DDAH están sujetas a inhibición postrascripcional por medio de las ROS generadas por la NADPH oxidasa y la HHcy. Se han identificado múltiples factores que regulan la transcripción del gen DDAH y la actividad de las DDAH.

Los agentes que incrementan el estrés oxidativo, reducen la expresión del gen DDAH2. Contrariamente, los factores antioxidantes, incrementan la expresión del gen DDAH2 (Tabla 12 y figuras 41,42). Se desconocen los mecanismos moleculares implicados en la expresión y actividad de las DDAH.

Tabla 12. Factores que regulan la expresión del gen DDAH2¹⁷⁷

Factores que disminuyen su expresión

El factor CF6, un componente esencial en la transducción de energía de la ATP sintasa mitocondrial

Los lipopolisacaridos

La hiperglicemia

Las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox)

El factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

El colesterol

La infección por citomegalovirus

La hiperhomocisteinemia (HHcy)

Factores que aumentan su expresión

Los ácidos trasretinóicos

La pioglitazona (un ligando del receptor gama activado del proliferador de peroxisomas)

El estradiol (contrarresta los efectos de las LDLox sobre las células endoteliales humanas)

DDAH2 (dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2); CF6 (mitochondrial coupling factor 6); ATP (adenosintrifosfato).

12.6 ADMA, NOS y DDAH

La disminución de la L-arginina o del BH₄ interrumpe el flujo de electrones hacia la eNOS y la nNOS, generando falta de acoplamiento enzimático e incremento de superóxidos. La interacción química entre el anión superóxido y el NO oxida el BH₄, produciendo peroxinitrito (BH₂).

El BH₂ perpetúa la falta de acoplamiento de las NOS, incrementando los superóxidos y la ADMA, además de alterar la actividad de las DDAH. La ADMA a su vez inhibe las NOS generando falta de acoplamiento de las DDAH e incremento de superóxidos (a través de la eNOS y de la iNOS), promovida por los lipopolisacáridos de las células endoteliales. Sin embargo, para que esto suceda, se requieren niveles significativamente elevados de ADMA. Estos hallazgos señalan la importancia de interrumpir el ciclo oxidativo a nivel de las DDAH y el consiguiente aumento de la ADMA a nivel celular¹⁷⁷ (Figura 42).

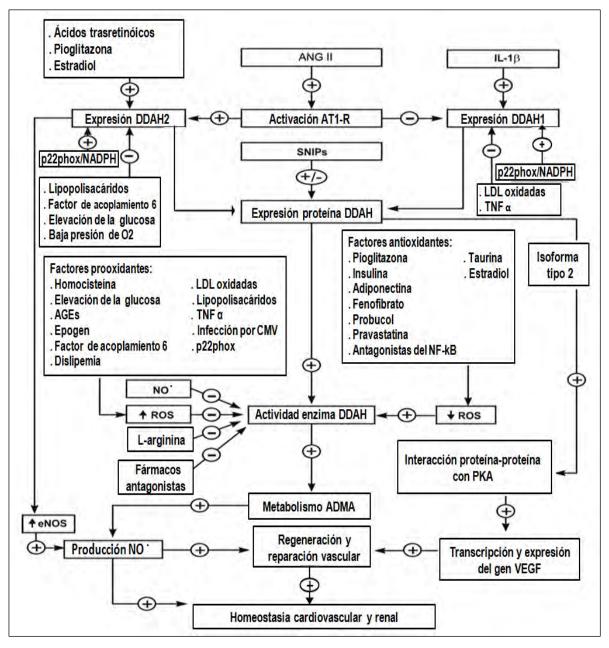


Figura 42. DDAH, homeostasia cardiovascular y renal. Principales factores que regulan la actividad y expresión de las dimetilarginina dimetilaminohidrolasas (DDAH) y sus implicaciones en la función cardiovascular y renal. NADPH oxidasa (fosfato nicotinamida adenina dinucleotido oxidasa); p22phox (*critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system*); NADH (nicotinamida adenina dinucleotido en su forma reducida); O (oxígeno); AGEs (glicación avanzada de productos terminales); epogen (epoetin alfa)⁽¹⁾; TNFα (factor de necrosis tumoral α); LDLox (lipoproteínas de baja densidad oxidadas); CMV (citomegalovirus); AT1-R (receptor tipo 1 de la angiotensina II/ANG II); SNIPs (polimorfismos de inserción de un solo nucleótido); ROS (especies reactivas del oxígeno); IL-1β (interleucina 1 β); NF-kB (factor de transcripción nuclear kappa B); PKA (proteína cinasa A); VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular); eNOS (sintasa endotelial del oxido nítrico); NO˙ (óxido nítrico); BP (presión arterial). (1) Medicamento utilizado para tratar la anemia y evitar la transfusión de glóbulos rojos en pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis. Adaptada de: *Palm F, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;293:H3227-H3245*¹⁷⁷.

13. Epigenética

"Nothing in biology makes sense except in the light of evolution".

Theodosius Dobzhansky²⁷⁸ (1900-1975).

"The difference between genetics and epigenetics can probably be compared to the difference between writing and reading a book. Once a book is written, the text (the genes or DNA stored information) will be the same in all the copies distributed to the interested audience. However, each individual reader of a given book may interpret the story slightly differently, with varying emotions and projections as they continue to unfold the chapters. In a very similar manner, epigenetics would allow different interpretations of a fixed template (the book or genetic code) and result in different read-outs, dependent upon the variable conditions under which this template is interrogated".

Thomas Jenuwein 134.

El término epigenética fue acuñado por Conrad Waddington (1905-1975) en 1942^{134,279}, para referirse a la ciencia que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan lugar al fenotipo. Sin embargo, las primeras nociones de epigenética reportadas en la literatura datan de mediados del siglo XIX, si bien sus orígenes se remontan a 300ac (antes de Cristo) a las doctrinas de Hipócrates y Aristóteles (384-32ac.)^{134,280}.

El conocimiento de que un mismo genotipo da lugar a diferentes fenotipos (mediante la regulación epigenética de la función génica), se ha consolidado a través del tiempo. Del mismo modo, el concepto de epigenética ha evolucionado paralelamente al avance en la identificación de los mecanismos moleculares involucrados en las vías epigenéticas. Inicialmente se aludió a la epigenética, como al estudio de los cambios heredables del genoma que suceden sin alterar la secuencia del DNA. No obstante, múltiples procesos de la expresión génica (durante la diferenciación celular) involucrados en la determinación del fenotipo, no son heredables. Un planteamiento más moderno, alude que la epigenética estudia las modificaciones genéticas estables que generan cambios en la expresión y en la función de los genes que no alteran la secuencia del DNA. Aunque este enunciado precedente ha sido ampliamente aceptado entre los científicos, recientemente se propuso a la epigenética, como aquella ciencia que estudia los mecanismos moleculares implicados en el estado funcional de la cromatina²⁸¹.

En circunstancias fisiológicas, las células somáticas que proceden de una célula progenitora única (que contienen un mismo genotipo) se diferencian y adquieren rasgos y funciones propias mediante la expresión o la supresión ("silenciamiento, inactivación, inhibición, represión") de algunos genes¹³⁸⁻¹⁴⁰. En nuestro organismo existen cientos de líneas celulares. Si bien todas estas células poseen el mismo origen, las características (estructurales, moleculares y funcionales) difieren entre ellas. Las neuronas, los hepatocitos, los cardiomiocitos, las células del sistema de conducción del corazón y las VSMC, son sumamente heterogéneas. En el genoma humano existen ~30.000 genes, por ende, la trascendencia de la supresión génica no debe subestimarse. Tanto la formación como el destino de las células se controlan mediante la expresión y la supresión selectiva de los genes. Este complejo proceso está regulado por mecanismos epigenéticos. Luego, el fracaso en la supresión de algunos genes puede generar consecuencias dramáticas en la homeostasia del organismo¹³⁴.

Los mecanismos epigenéticos explican las modificaciones del material genético que suceden como consecuencia del entorno en algunos fenómenos de la naturaleza (mediante el silenciamiento génico). Este hecho, ha permitido a los científicos estudiar la modulación de la expresión génica. Un complejo mecanismo que permite a un mismo genoma expresarse de diferentes formas (epigenomas) en todo el organismo.

En el año 2006, Andrew Fire (*Stanford, CA*) y Craig Mello (*Massachusetts, MA*), fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología por el descubrimiento del RNA de interferencia (iRNA) o siRNA (s*mall interfering RNA*) en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, publicado en la revista *Nature* en 1998²⁸². La introducción de RNA antisentido en la célula interrumpe la expresión génica.

En el mismo año, Roger Kornberg seguramente influenciado por su padre Arthur Kornberg (Premio Nobel en 1959 por sus trabajos sobre la DNA polimerasa-la enzima que facilita la replicación del DNA), recibió el Premio Nobel de Química por sus aportaciones

en el estudio de la transcripción génica. Sus descubrimientos han permitido comprender como el DNA se trasforma en RNA por acción de la RNA polimerasa II²⁸³ (RNAasa II). Roger Kornberg y otros científicos, describieron los principios básicos que rigen la conversión de la información almacenada (DNA), en la información funcional (RNA) en la cromatina de las células eucariotas. Tanto en los animales como en las plantas, el siRNA representa un mecanismo de defensa nativo contra la invasión del material genético, constituyendo a su vez, uno de los elementos responsables del silenciamiento génico durante el desarrollo. El siRNA (iRNA) presenta enormes implicaciones terapéuticas, ya que la identificación y supresión de los genes defectuosos representan una enorme promesa en el tratamiento de las enfermedades con componente genético¹³⁴.

En 2008, David Baulcombe, Victor Ambros y Gary Ruvkun, recibieron el prestigioso galardón: "Albert Lasker Basic Medical Research Award" por el descubrimiento de los microRNAs (http://www.laskerfoundation.org/awards/2008_b_description.htm).

En los modelos murinos, la supresión del gen *Dicer*, promueve la formación de neoplasias y otras enfermedades adquiridas. El gen *Dicer* es fundamental en la biogénesis de los microRNAs (miRNAs), ya que modula la expresión de la enzima *Dicer*; una endoribonucleasa perteneciente a la familia de la RNA polimerasa III (RNAasa III) presente en el citoplasma de las células. Esta enzima corta los RNAs de doble hebra (*double-stranded RNA o dsRNA*) y los pre-miRNAs en pequeños fragmentos de dsRNA de ~20-25 bp (pares de bases) de longitud. En las células, estos diminutos fragmentos de RNA regulan la expresión de gran número de genes. Tanto los siRNAs, como los miRNAs, son producidos mediante *"dicing"* por acción de las enzimas *Dicer*.

La inactivación del cromosoma X en las hembras, se explica al menos parcialmente por mecanismos epigenéticos. Los *calico cats* siempre son hembras, lo que significa que poseen dos cromosomas X en cada célula. El gen que codifica el color naranja del pelaje se localiza en el cromosoma X. No obstante, existe otro alelo del mismo gen que codifica

el color negro del pelo. En las hembras, uno de los dos cromosomas X permanece inactivo en todas las células. En consecuencia hereda un par de alelos (naranja y negro), por lo que su pelambre presenta manchas de ambos colores. No obstante, el proceso de inactivación del cromosoma X es aleatorio, por lo que la clonación de los *calico cats*, nunca producirá el mismo patrón.

Adicionalmente, la epigenética es vital para el progreso de la tecnología aplicada a las células madre (stem cells). Estas células totipotenciales se diferencian hacia cualquier línea celular del organismo en respuesta a ciertos estímulos. Se ha descubierto que el DNA de las células madre es más prono a la manipulación epigenética. En la medida en que las células desarrollan una línea celular específica ("se especializan"), "restringen" el acceso a ciertas regiones de su genoma mediante diversas modificaciones epigenéticas. Este acceso que ha sido restringido, se manifiesta posteriormente como su potencial limitado. Sin embargo, se desconoce el itinerario epigenético de las células madre. Los científicos pretenden desarrollar líneas celulares predeterminadas epigenéticamente) con fines específicos (regeneración del tejido neurológico, cardiaco, vascular) en los cultivos de células madre (Figura 43).

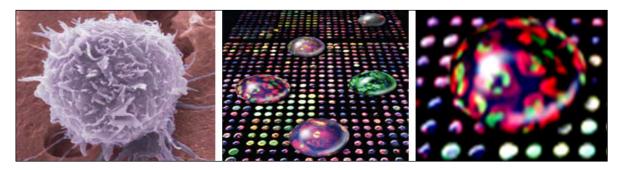


Figura 43. Células madre. Izquierda. Imagen de una célula totipotencial (célula madre/stem cell) de la médula ósea humana tomada mediante SEM (scanning electron microscopic). Imagen de Andrew Leonard (www.aplmicro.com). Centro y derecha. Cultivos de células madre en diferentes biomateriales. Fotografías de: Daniel G Anderson. Imágenes reproducidas de: Epigenetic?. The Epigenome Network of Excellence. 2006. copyright © Epigenome NoE¹³⁴.

Los fenómenos epigenéticos implican numerosas modificaciones químicas del material genético, las cuales no alteran la secuencia de los nucleótidos del genoma (Figura

44). Un hecho crucial en dichos fenómenos es su reversibilidad, lo que implica que el código genético permanece inalterado. Por consiguiente, es fundamental reconsiderar el concepto de fenotipo (definido desde antaño), frente a su acepción contemporánea en el contexto epigenético; ya que el fenotipo particular de cada célula, no se define exclusivamente por la secuencia de los nucleótidos del DNA, presentes en el genoma. El genotipo, el entorno y la epigenética, generan un fenotipo específico^{284,285}. Los mecanismos que conforman la maquinaria de metilación epigenética hacen parte de ciertos procesos celulares vitales para el desarrollo del organismo, como la diferenciación celular y la respuesta celular al estrés²⁸⁴⁻²⁸⁶.

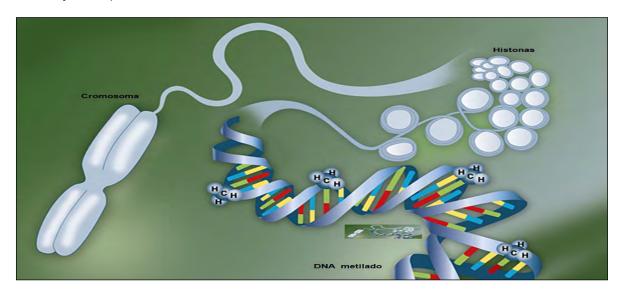


Figura 44. Modificaciones químicas del material genético. Las transformaciones químicas del DNA y las histonas promovidas por factores epigenéticos se heredan a través de las sucesivas divisiones celulares. Estas modificaciones no alteran la secuencia de los nucleótidos del genoma, lo que implica que el código genético permanece incólume. Estas modificaciones del DNA hacen parte de ciertos procesos celulares esenciales. Reproducida con mínimos cambios en la forma de: *Cassiday LA. Chem Eng New. 2009;87(37):11-16*²⁸⁶.

Los primeros descubrimientos epigenéticos fueron realizados en las células cancerosas²⁸⁷. Este hallazgo ha sido solo el comienzo de la caracterización de los epigenomas que subyacen a multitud de patologías (neurológicas, inmunológicas y cardiovasculares), entre otras enfermedades. Hoy día es factible dilucidar la totalidad de los epigenomas representados en las marcas epigenéticas de un determinado tipo celular. La epigenética regula la variación fenotípica, tanto en la salud como en la enfermedad. En

consecuencia, el epigenoma permitirá optimizar el entendimiento de las enfermedades en los seres humanos. La epigenética además ofrece una nueva perspectiva en las actuaciones preventivas y terapéuticas dirigidas a mejorar la salud^{57,288}. Dada la reversibilidad del proceso epigenético y a que las proteínas son cruciales en dicho proceso, las proteínas constituyen blancos potenciales en las intervenciones farmacológicas y de prevención²⁸⁹.

En este prometedor campo de investigación se vienen evaluando fundamentalmente dos tipos de tratamientos epigenéticos²⁸⁹⁻²⁹¹: 1. Los inhibidores de la metilación del DNA. 2. Los inhibidores de las deacetilasas de histonas (HDACi). Las deacetilasas de histonas (HDAC), merced a su interacción con determinados factores de transcripción, son enzimas claves en el control de diversos procesos biológicos como: a. La expresión génica. b. La homeostasia celular. c. Regulación del ciclo celular. d. Diferenciación celular. e. Apoptosis celular. f. Proceso de envejecimiento. g. Reparación del DNA (Figura 45).

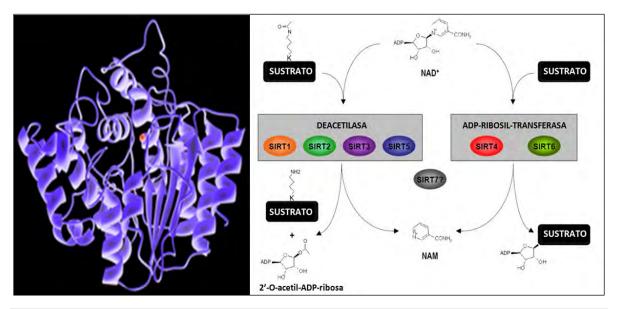


Figura 45. Deacetilasas de histonas y sirtuinas. Izquierda. Modelo estructural de las deacetilasas de histonas (HDAC). Las HDAC humanas están agrupadas en cuatro clases (I-IV), basándose en su similitud con las HDAC de la levadura. Las HDAC I, II y IV (HDAC clásicas) comparten semejanzas en sus secuencias y requieren Zn⁺ para cometer su actividad enzimática. De otro lado, las HDAC III (sirtuinas) difieren en su homología de las HDAC clásicas. Las HDAC constituyen un blanco terapéutico de un novedoso grupo de fármacos epigenéticos. Imagen reproducida de: *Epigenetic?.The Epigenome Network of Excellence. 2006.* copyright © *Epigenome NoE*¹³⁴. Derecha. Las sirtuinas (SIRT) comprenden una familia de proteínas (deacetilasas) y/o ADP ribosiltransferasas dependientes de NAD+ (nicotinamida-adenina-dinucleotido) como cofactor, las cuales generan NAM (nicotinamida), siendo la NAM a a su vez un inhibidor endógeno de las SIRT. Las SIRT derivan el nombre de su paralelismo con la familia SIR2 de la levadura S. cerevisiae v se caracterizan por tener gran variedad de proteínas diana sobre las que ejercen su actividad (sustratos histónicos y no histónicos). Las SIRT se encuentran implicadas en diversos procesos celulares vitales: 1. Senectud. 2. Metabolismo. 3. Adaptación al estrés oxidativo. 4. Silenciamiento epigenético de los telómeros⁽¹⁾, del DNA ribosómico nucleolar y de otros genes. Gráfica adaptada de: Feige JN, Auwerx J. Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology. Curr Opin Cell Biol.2008;20(3):303-309. (1) The 2009 Nobel Prize in Physiology or Medicine was awarded to Drs. Elizabeth H Blackburn, Jack W Szostak and Carol W Greider for their discovery of how chromosomes are protected by telomeres and the enzyme telomerase. http://nobelprize.org.

Actualmente se vienen desentrañando los mecanismos moleculares de diversos fenómenos epigenéticos a un compás sorprendente. Paulatinamente se van descubriendo las principales rutas epigenéticas mediante novedosos abordajes y sofisticados instrumentos. No obstante, aún el reto es enorme^{57,291}.

Después del desentrañamiento del genoma humano, no sorprende que la epigenética haya pasado de la penumbra, a ser uno de los tópicos más álgidos en biología. La epigenética ha evolucionado recientemente desde la compilación de una serie de fenómenos biológicos documentados como meras curiosidades científicas e inexplicables genéticamente, hasta constituirse en un extenso y apasionante campo de estudio. Se

prevé que el estudio del epigenoma en las diversas líneas celulares del organismo (tanto en su estado fisiológico como patológico) permitirá a los investigadores comprender mejor la epigenética y por ende las enfermedades^{280,286}.

13.1 Métodos de cribado (screening) epigenéticos

"I hope that by the end of the Road Map Program, epigenomic analysis won't be something that only experts utilize. Rather, it will be used routinely in labs to investigate diseases and develop therapies".

John S. Satterlee⁵⁸.

Aunque se ha logrado descifrar la secuencia del genoma humano, nuestra comprensión de la compleja red que acontece en el interior de las células, dista cuantiosamente de ser completa. La cartografía del epigenoma humano como reto posterior al secuenciamiento del genoma, representa un arduo cometido. Si bien es loable determinar el estado epigenético de la secuencia del genoma, la cartografía de la totalidad del epigenoma humano requerirá del secuenciamiento de decenas de genomas que engloban las diferentes líneas celulares del organismo en los diferentes estados del desarrollo⁵⁷. La cartografía física del genoma mediante la técnica del bisulfito, es en la actualidad el método más empleado para determinar el grado de metilación de los genes^{286,291} (Figura 46). Se vienen desarrollando diferentes instrumentos que utilizan la diferencia en la afinidad de las enzimas de restricción hacia los dinucleótidos CpG (nucleótidos pareados de citosina y guanina del genoma) metilados y no metilados. Adicionalmente, se están perfeccionando otras técnicas que incorporan las ventajas de la tecnología chip en el estudio del DNA, entre otros métodos. Este último procedimiento permite establecer rápidamente el grado de metilación de miles de islas CpG simultáneamente, empleando las técnicas de metilación diferenciada mediante hibridación^{286,292}.

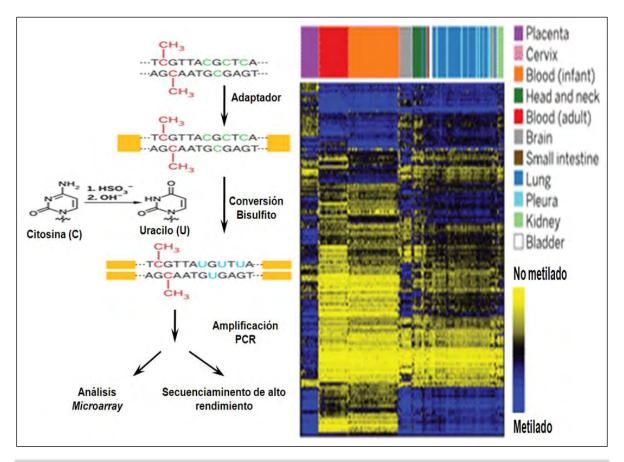


Figura 46. Cartografía del genoma mediante la técnica del bisulfito. Izquierda. El bisulfito de sodio transforma los residuos de citosina (C) no metilados (reflejados en color verde) en uracilo (U) matizados en color azul, en el DNA del genoma. Las C metiladas (mostradas en color rojo) son resistentes a dicha conversión y se identifican a través del secuenciamiento de alto rendimiento y del *microarray*. Las barras amarillas representan secuencias de DNA unidas a los segmentos terminales de cada fragmento de DNA que permiten su amplificación mediante PCR (*polymerase chain reaction*). Reproducida con modificaciones de forma de: *Cassiday L. Chem Engin News. 2009. 87(37):11-16*²⁸⁶. Derecha. Imagen de Brock Christensen. El DNA tratado con bisulfito y analizado mediante *microarray* revela grados de metilación tejido-específica. Cada hilera del *microarray* representa el dinucleótido CpG y cada columna constituye una muestra de tejido de diferentes individuos. Las barras expuestas en diversos colores y situadas en la parte superior de las columnas del *microarray* señalan el tipo de tejido de las muestras. Adaptada de: *Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, Zheng S, Wrensch MR. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. PLoS Genetics 2009. 5(8):e1000602.*

13.2 Epigenética y medio ambiente

La expresión de los genes permanece estable a través de múltiples generaciones celulares, aunque se modifica durante el desarrollo del organismo y en respuesta a diversos estímulos del entorno (ambiente). El perfil epigenómico varía de un tipo celular a otro y a través del tiempo, merced a diferentes aspectos: fisiológicos (tipo de tejido, etapa del desarrollo, envejecimiento); patológicos (cáncer); farmacológicos (medicamentos);

nutricionales (dieta); ambientales (contaminantes, partículas en suspensión) y conductuales (hábitos de los progenitores), entre otros condicionantes del entorno^{293,294}. Este hecho es trascendental en los fenómenos epigenéticos¹³⁸⁻¹⁴¹ (Figura 47). A su vez, los factores genéticos y el entorno influyen en la génesis de las enfermedades.



Figura 47. Epigenética y medio ambiente. La epigenética representa la interrelación entre el genotipo, el fenotipo y el entorno (ambiente). El epigenoma se ve afectado por diferentes aspectos del desarrollo y por los condicionantes del entorno. El perfil epigenómico cambia a través del tiempo, en respuesta a diferentes factores. El entorno promueve modificaciones en la cromatina. En el centro de la Imagen, los nucleótidos (reflejados en tono amarillo) a lo largo de la estructura del DNA (mostrado en color rosa) se disponen en espirales adheridas alrededor de las histonas (expuestas en matices azul y blanco), conformando los cromosomas (visualizados en bermellón) en el núcleo de la célula. Imagen central delegada por Geneviève Almouzni y realizada por Nicolas Bouvier. Modificada de: *Epigenetic?. The Epigenome Network of Excellence.* 2006. copyright © Epigenome NoE¹³⁴.

Las modificaciones epigenéticas representan el elemento de conexión entre los genes y el entorno^{295,296}. Por consiguiente, podemos entender la epigenética como un complejo mecanismo molecular central del organismo. Se ha sugerido la existencia de un código epigenético que trasciende al código genético y regula la información almacenada en el genoma^{134,297} (Figura 48).

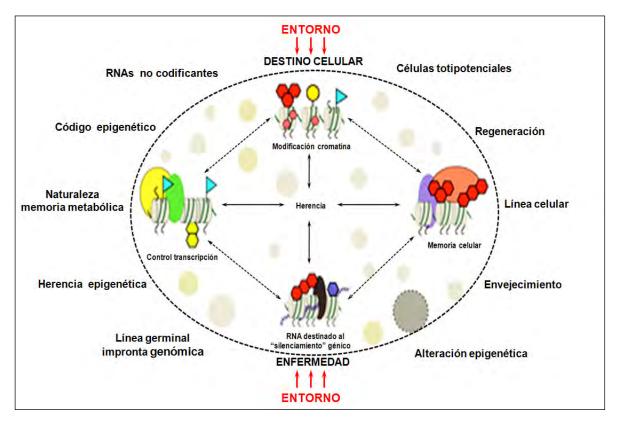


Figura 48. Impacto epigenético sobre el control génico. Diversas modificaciones bioquímicas del DNA y de las histonas, tales como la metilación del DNA (simbolizada con los hexágonos pequeños), la metilación de las histonas (hexágonos grandes), la acetilación (triángulos) y la fosforilación (círculos), acontecen como respuesta al entorno (ambiente) y modulan la estructura de la cromatina. La disposición de la cromatina regula el acceso de diferentes proteínas, incluyendo los factores de transcripción (óvalos) al DNA, regulando de esta manera la expresión de los genes. El impacto epigenético sobre el control génico ejerce acciones sobre varios sistemas biológicos: 1. La biología humana. 2. Las células madre. 3. El proceso de envejecimiento. 4. Patologías como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, entre otras nosologías. Reproducida con modificaciones de forma de: Akhtar A, Cavalli G. The Epigenome Network of Excellence. PLoS Biol. 2005;3(5):e177. http://www.plosbiology.org/article/info.

Existe evidencia creciente de que algunos rasgos "no heredables" presentan un mecanismo de trasmisión no genómica. La influencia de ciertos agentes que actúan en las fases iniciales del desarrollo modifican los patrones epigenéticos y se trasmiten a la progenie, repercutiendo en más de una generación²⁹⁸⁻³⁰⁰. Se presume que en esta transmisibilidad participan diferentes mecanismos epigenéticos^{141,301}. La metilación del DNA, la modificación covalente de las histonas, los fragmentos de RNA no codificantes (*small non-coding RNAs*) o RNAs, son los mecanismos epigenéticos más representativos. Todos estos mecanismos constituyen elementos esenciales en este modelo epigenético³⁰² (Figura 49).

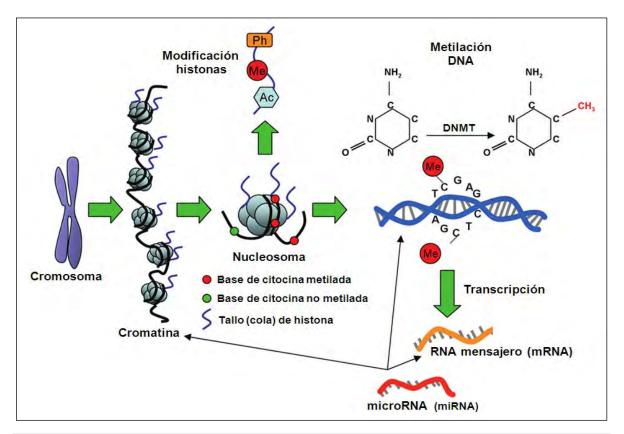


Figura 49. Modelo epigenético. Izquierda. Los cromosomas están compuestos por cromatina. La cromatina a su vez está conformada por el DNA envuelto alrededor de 8 unidades de histonas. Cada octámero de histonas constituye un nucleosoma. Los "tallos o colas" de las histonas (que protruyen a través de las mismas), sufren diversas modificaciones epigenéticas: fosforilación (Ph); metilación (Me); acetilación (Ac), entre otras modificaciones. Las moléculas del DNA se metilan mediante la adición de grupos metil (CH_3) al carbono ubicado en la posición cinco (C_5), situado en las bases de citocina (C) que se encuentran adyacentes a una base de guanina (C) de las regiones CpG del genoma. Esta reacción química está catalizada por las metiltransferasas del DNA (DNMT). La transcripción génica implica la conversión del DNA al RNA mensajero (mRNA). La metilación del DNA y la deacetilación de las histonas inhiben la transcripción génica. El mRNA se traslada a la proteína. Sin embargo, este proceso puede ser interrumpido por la incorporación de micro RNAs (miRNAs) al mRNA. Cada enlace de miRNA al mRNA puede alcanzar hasta 200 genes diana. Los miRNAs también se encuentran involucrados en la metilación del DNA y pueden alterar la estructura de la cromatina, al modificar las histonas. Adaptada de: Relton CL, Smith GD. PLoS Med. $2010;7(10):e1000356(1-8)^{302}$.

13.3 El Paradigma DOHaD

Las observaciones respecto a que las influencias en las etapas iniciales de la vida repercuten en el desarrollo de las enfermedades en la vida adulta, el denominado "paradigma DOHaD" (*Developmental Origins of Health and Disease*), ha permitido afinar nuestra comprensión de la biología humana. El fenómeno DOHaD, propuesto por Gluckman²⁹⁸⁻³⁰⁰, constituye un amplio subsidiario de diferentes procesos de la plasticidad

Relevancia de polimorfismos génicos y la S-homocisteína en la epigénesis en arteria mamaria interna y aorta

del desarrollo, a través de los cuales el organismo se adapta a su entorno durante el

curso de la vida.

Este proceso adaptativo permite conservar la variabilidad fenotípica mediante los

cambios transitorios del entorno. Las vías de señalización responsables de la plasticidad

fenotípica actúan particularmente en las fases iniciales del desarrollo. Estas vías de

señalización pueden afectar un solo órgano o sistema y producen ajustes integrados en el

fenotipo adulto mediante un proceso regulado por mecanismos epigenéticos e influenciado

por la "predicción" del entorno ulterior del organismo.

En los mamíferos, el entorno intrauterino adverso genera un abanico de respuestas

integradas mediante la participación de ciertos genes que "almacenan la información" de la

trayectoria del desarrollo, en espera de condiciones postnatales desfavorables del entorno.

La discrepancia entre el entorno anticipado y el entorno real del individuo, expone al

organismo a consecuencias adversas (a mayor discrepancia mayor riesgo).

En los humanos esta predicción es inexacta, debido a la gran variabilidad del entorno

posnatal. Sin embargo, se presume que los mecanismos epigenéticos contribuyen

decididamente a la epidemiogénesis de las enfermedades crónicas no trasmisibles como

las ECV ateroscleróticas. Gluckman y cols.300, postularon que el fenómeno DOHaD, es

consecuencia de una mala adaptación del mecanismo ancestral de la plasticidad del

desarrollo, que pudo haber tenido un valor adaptivo en la evolución de las especies como

el Homo sapiens.

13.4 Mecanismos epigenéticos

"It is tempting to wonder if this twisted sugar string of purine and pyrimidine base beads is, in fact, God".

James Dewey Watson.

To answer Watson, "The genetic alphabet is more akin to the word of God, and its translation to his hand"

The Epigenome Network of Excellence 134.

Las cinco bases nitrogenadas (adenosina, citosina, guanina, timina y uracilo) que

forman parte de los ácidos nucléicos (DNA y RNA) se representan en el código genético

con las letras: A, C, G, T, U, respectivamente. La secuencia de los nucleótidos del genoma

151

humano permanecen inalterados a lo largo de la vida de cada individuo. Si bien, el DNA y las histonas sufren modificaciones químicas (epigenéticas) motivadas por diversos estímulos¹³⁸⁻¹⁴¹. A mayor discrepancia en el estilo de vida entre las personas, mayor será la diferencia en el grado de metilación del DNA y de las histonas (Figura 50).

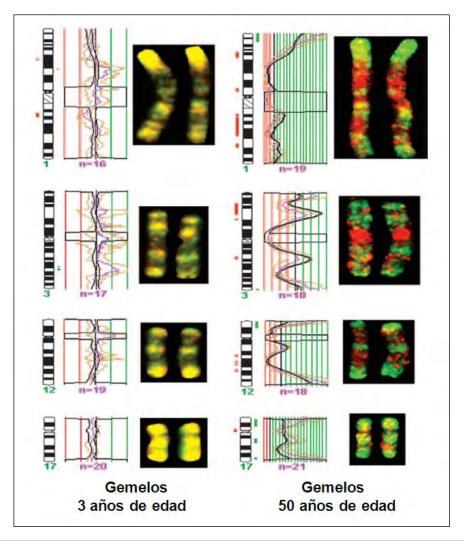


Figura 50. Cartografía cromosómica en gemelos monocigotos. El delicado ajuste bioquímico del genoma determina cuales genes se expresan. En consecuencia, los gemelos monocigotos no están necesariamente predeterminados a compartir el mismo destino, ya que el DNA de cada uno de ellos presenta modificaciones epigenéticas disímiles. Por consiguiente, no es correcto afirmar que los gemelos monocigotos son idénticos. Si bien sus similitudes son mayores que sus discrepancias, sus diferencias son más acusadas a lo largo del proceso de envejecimiento. En la imagen de Fraga y cols., se exhibe la cartografía realizada a través de la técnica de la metilación diferencial del DNA mediante hibridación. En esta imagen, se muestran los resultados de la hibridación competitiva de los cromosomas 1, 3, 12 y 17 durante la metafase en parejas de gemelos de 3 y 50 años de edad. Los gemelos a los 50 años de edad presentan marcados cambios en el grado de metilación del DNA evidenciados por la presencia de matices verdes y rojos (hipermetilación e hipometilación del DNA, respectivamente). Por el contrario, en los gemelos a los 3 años de edad, el grado de metilación del DNA es bastante similar (reflejado en tono amarillo, verde y rojo). En el ideograma, las variaciones en el grado de metilación del DNA, están representadas en barras rojas y verdes. Tomada de: *Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. The National Academy of Sciences of the USA (PNAS). 2005;102(30):10604-10609.*

Potencialmente todos los cromosomas del organismo pueden presentar modificaciones epigenéticas las cuales inactivan la expresión de algunos genes que deberían protegernos contra las enfermedades, haciendo que los cromosomas se tornen frágiles y aparezcan diversas patologías 302,303. Jörn Walter, afirmó en sentido figurado: "I would take a picture of a computer and say that the hard disk is like DNA, and then the programmes are like the epigenome. You can access certain information from the hard disk using the programmes on the computer. But there are certain password protected areas and those which are open. I would say we're trying to understand why there are passwords for certain regions and why other regions are open". Del mismo modo Neil Brockdorf puntualizó: Epigenetic marks regulate the 'open' or 'closed' state for regions of the genome and thereby control the 'on' and 'off' status of genes. A key point is that epigenetic marks can be heritable and provide a means to transmit the 'on' or 'off' state through the process of cell division"134.

Las modificaciones epigenéticas mejor estudiadas son: la metilación de la citosina del DNA y la modificación covalente postrasduccional de las histonas^{57,287}.

13.5 Metilación del DNA

El primer mecanismo epigenético descubierto y mejor caracterizado, es la metilación covalente de los residuos de citosina de las moléculas del DNA²⁸⁷. La metilación del DNA consiste en la adición del grupo metil (CH₃), al anillo aromático de la citosina del DNA, situada previa y contiguamente a una guanina. En las células eucariotas este grupo metil se incorpora al carbono en la posición 5 de la citosina presente en el dinucleótido CpG 11134 del genoma^{138,304}. En bilogía del desarrollo, la metilación del DNA representa el principal mecanismo epigenético de los mamíferos. Este mecanismo ejerce gran influencia en la transcripción y en la expresión génica, siendo uno de los responsables de la plasticidad fenotípica^{25,305}. La metilación del DNA es un proceso dinámico y reversible³⁰⁵, pudiendo afectar genes clásicos o miRNAs^{303,306} (Figura 49).

Como delineamiento general, la metilación del DNA inhibe la transcripción génica, mientras que la hipometilación (pérdida de metilación del DNA) produce activación transcripcional. La hipometilación del DNA en la región codificante y en el intrón del gen, produce inestabilidad cromosómica, reactivación de transposones (elementos parásitos del DNA) y alteraciones de la impronta genómica¹³⁸⁻¹⁴¹. La hipermetilación en la región del promotor del gen (en ciertos genes "supresores"), hace parte de diferentes procesos fisiológicos: 1. La regulación del ciclo celular. 2. La adhesión celular. 3. La reparación del DNA. 4. La apoptosis. 5. La angiogénesis.

En las células somáticas humanas ~1% de las citosinas se encuentran metiladas³⁰⁷, aunque existe variabilidad tisular (~3-6%)²⁸⁵. Esta proporción de citosinas metiladas corresponde ~70-90% del total de la citosinas de los dinucleótidos CpG del genoma³⁰⁸⁻³¹⁰. Las regiones del genoma en las cuales se concentran los dinucleótidos CpG se denominan islas CpG. Las islas CpG poseen una proporción de citosina y guanina superior al 55%. En el genoma humano existen ~45.000 islas CpG. En los mamíferos las islas CpG se localizan en la región del promotor del gen o en el primer exón de ciertos genes (~40% de los genes). La distribución de la secuencias de los dinucleótidos CpG no se realiza al azar y su frecuencia es menor que la que cabría esperarse estadísticamente en el genoma (fenómeno de supresión de las islas CpG).

Funcionalmente los dinucleótidos CpG de la región reguladora 5' del promotor del gen no se encuentran metilados. Si bien, en determinadas circunstancias pueden metilarse interrumpiendo la transcripción génica. Por el contrario, las islas CpG de los intrones de los genes y de los elementos repetitivos del DNA del genoma están habitualmente metilados^{285,310}. Exclusivamente una pequeña proporción de la metilación global del genoma obedece a la metilación del promotor de los genes, ya que la mayor parte de los dinucleótidos CpG metilados se localizan en las secuencias repetitivas del genoma como retrovirus endógenos³¹¹, permaneciendo en estado "silente" e impidiendo la amplificación

de nuevas partículas y su posterior inserción en el genoma³⁰⁹. La metilación del DNA constituye un mecanismo de defensa contra la inestabilidad cromosómica y la interrupción génica causada por la reactivación de estos transposones³¹¹ (Figura 51).

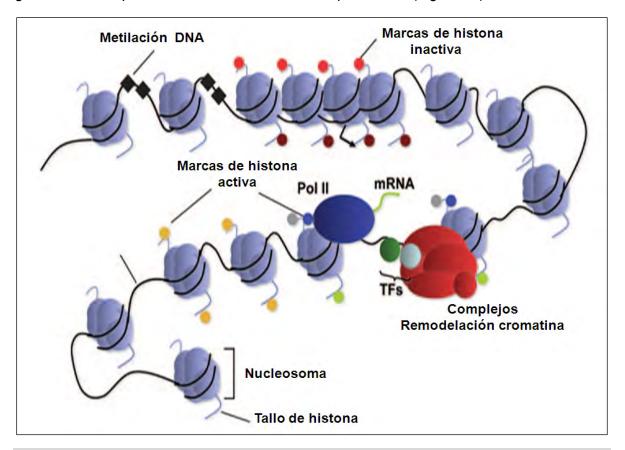


Figura 51. Representación de la cromatina y expresión génica. Los factores de transcripción (TFs) son moléculas, proteínas o pequeños fragmentos de RNA no codificantes (short/small non-coding RNA o RNAs), que interactúan en grupos o complejos involucrados (as) en la regulación de la expresión de los genes. DNA (ácido desoxiribonucléico); Pol II (polimerasa II); mRNA (RNA mensajero); RNA (ácido ribonucléico). Adaptada de: Bruneau BG. Epigenetic Regulation of the Cardiovascular System: Introduction to a Review Series. Circ Res. 2010;107:324-326.

En los mamíferos, además de la importancia de la metilación del DNA en la expresión génica y en la inactivación de las secuencias repetitivas de los elementos transponibles de los cromosomas, los cambios en el grado de metilación del DNA más importantes se producen durante el desarrollo embrionario³¹². Después de la fecundación se elimina el patrón previo de metilación del DNA y se establece el nuevo patrón de metilación del genoma (metilación *de novo*), indispensable para: 1. La expresión de ciertos genes (tejido-

específica). 2. La inactivación del cromosoma X en las hembras. 3. El proceso de impronta genómica (expresión selectiva de un gen de acuerdo al origen parental del alelo).

La metilación del DNA altera la transcripción génica de diferentes formas: 1. Al incorporarsen las citosinas metiladas al surco mayor de la doble hélice del DNA. En esta circunstancia se bloquea el acceso de los factores transcripcionales a su centro activo, interrumpiendo la transcripción génica³¹³. 2. Al disminuir la actividad de la RNA polimerasa II³¹⁴. 3. Mediante el reclutamiento de proteínas portadoras de dominios MBD (*methyl binding domain*) o DMR (dominios de cromatina con metilación diferenciada) en el promotor del gen³¹⁵. La incorporación de estas proteínas MBD al DNA metilado dificulta el acceso de los factores de transcripción. 4. Al modificar la estructura de la cromatina³¹⁶ (Figura 51).

13.5.1 Metiltransferasas del DNA

Las DNMT son las enzimas responsables de la metilación del DNA, siendo a su vez dependientes de la SAM. Se han identificado 4 genes que codifican las diferentes isoenzimas de las DNMT, si bien, exclusivamente se han caracterizado tres de ellas: DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. Las DNMT presentan afinidad particular hacia la metilación de ciertos sustratos. La DNMT1 actúa sobre el DNA hemimetilado, a diferencia de las DNMT (3A v 3B), que ejercen su acción sobre el DNA no metilado 151,317.

Se conocen dos reacciones de metilación del DNA catalizadas por las DNMT: 1. La metilación *de novo*, en la cual se adicionan grupos metil a las secuencias no metiladas previamente para establecer el nuevo patrón de metilación (posterior a la desmetilación masiva del genoma) durante la embriogénesis. La DNMT3A y la DNMT3B, son las enzimas responsables de la metilación *de novo* del DNA. 2. La metilación de mantenimiento, mediante la cual se conserva el patrón de metilación del DNA después de la replicación celular. La DNMT1 es la enzima encargada de este proceso y es la enzima predominante en las células somáticas^{291,317}.

13.5.2 Desmetilación del DNA

La desmetilación del DNA es el mecanismo mediante el cual se eliminan los patrones previos de metilación del DNA del genoma. Este fenómeno se lleva a cabo en el genoma paterno durante la fertilización y en el genoma materno durante el desarrollo del cigoto³¹⁸. Posteriormente a la desmetilación masiva del genoma sobreviene el nuevo proceso de metilación del DNA (metilación de novo). Existen diferentes enzimas involucradas en la desmetilación del DNA, aunque se desconocen los mecanismos intrínsecos que regulan este proceso^{317,319}.

13.6 Modificación de histonas

En la mayoría de las células eucariotas (células que poseen núcleo verdadero, separado del citoplasma por doble membrana y en cuyo interior se encuentra el material genético), el DNA genómico se encuentra replegado y compactado con diversas proteínas (entre las que destacan las histonas), formando un polímero sumamente dinámico, denominado cromatina³²⁰. Las histonas son proteínas básicas que contienen ~20% de aminoácidos con carga positiva, como la arginina y la lisina³²¹. Filogenéticamente, en las células eucariotas las histonas son proteínas con elevado grado de conservación. Este hecho, sugiere que la cromatina surgió durante la evolución para almacenar y preservar el DNA en el núcleo de las células³²² (Figura 52).

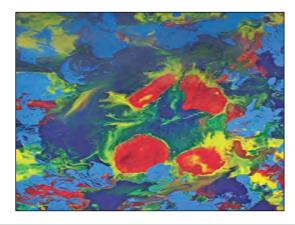


Figura 52. Subunidad de Histonas. Pintura de David Sweatt (*Histone Subunit*). En esta admirable obra maestra, el artista refleja con perspicacia la estructura y naturaleza del dinamismo del nucleosoma. Imagen adaptada de la portada de la revista: *nature biotechnology (volúmen 28, número 10, de octubre de 2010).*

13.6.1 Cromatina, histonas y organización del núcleo celular

"The major problem, I think, is chromatin... you can inherit something beyond the DNA sequence. That's where the real excitement of genetics is now".

James Dewey Watson 323.

Las histonas conforman la estructura macromolecular de los cromosomas y permiten o no el acceso de los factores transcripcionales al DNA^{297,320}. Los cambios en la estructura de la cromatina afectan la accesibilidad de los factores de transcripción génicos. Las histonas desempeñan diferentes funciones: 1. Organizan la cromatina en el interior del núcleo de las células eucariotas. 2. Participan en diversos procesos fisiológicos como: a. La reparación del DNA. b. La regulación de ciclo celular. c. La apoptosis. d. La diferenciación celular. e. El proceso fisiológico del envejecimiento^{321,324}.

El nucleosoma constituye la unidad fundamental y repetitiva de la cromatina (Figuras 49 y 53). El nucleosoma está compuesto por 146 pares de bases (pb) del DNA, al cual rodean, generando ~1'7 vueltas alrededor del octámero de histonas. El octámero de histonas está conformado por dos dímeros de histonas (H3 y H4) y un tetrámero de histonas H2A y H2B^{320,325}.

Los nucleosomas se condensan conformando la cromatina, al replegarse el DNA en el núcleo de la célula. Cuando la cromatina se compacta, se limita la accesibilidad a los factores de transcripción. Mediante este mecanismo la célula regula diversos procesos mediados por el DNA, tales como; la transcripción génica, la replicación y la reparación del DNA³²⁵.

Funcionalmente existen diferentes niveles de compactación de la cromatina, por lo que se diferencia entre la eucromatina y la heterocromatina (Figura 53). Thomas Jenuwein afirmó sobre el nucleosoma: "While DNA is the unit for genetic information, the nucleosome is the unit of epigenetic information that can respond to environmental signals and influence the way genes work" 134.

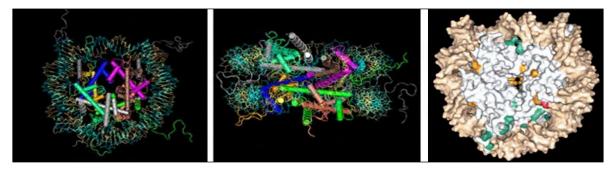


Figura 53. El nucleosoma. Izquierda y centro. El nucleosoma constituye la unidad básica y repetitiva de la cromatina ("replegamiento" del DNA). Cuando el DNA se compacta alrededor de las histonas (proteínas del nucleosoma) se interrumpe la transcripción génica. Reproducidas de: *Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). 2010 (Updated 2011)*²⁹¹. Derecha. Estructura en cristal del nucleosoma (diseño de la Dra. Karolin Luger-*Colorado State University*). Disposición del núcleo del octámero de histonas y los 146 pares de bases del DNA situados a su alrededor conformando una súper hélice. La disparidad de la unión entre las histonas y el DNA modifican la geometría de la súper hélice. Se exponen en diferentes matices las regiones acetiladas (verde), metiladas (amarillo), metiladas o acetiladas (rojo) y fosforiladas (azul) en varias histonas (blanco). El DNA *duplex* se muestra en color ámbar. Reproducida de: *Cassiday L. Chem Engin News.* 2009. 87(37):11-16²⁸⁶. Luger K, et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature.* 1997;389:251-260.

El término eucromatina hace alusión al estado en que la cromatina es accesible a los factores de transcripción y a la RNA polimerasa. Por ende, la eucromatina favorece la transcripción génica (síntesis de RNA mediante la copia de determinadas secuencias del DNA del genoma). Por el contrario, la heterocromatina se relaciona con inactividad transcripcional, ya que a diferencia de la eucromatina (que es más laxa), la heterocromatina se encuentra en las regiones cromosómicas en las que la cromatina está más compactada³²⁶. La heterocromatina se localiza en ciertos genes que no se expresan, como sucede en algunos tejidos (heterocromatina facultativa) o en las regiones del genoma en las que existen secuencias repetitivas de DNA (heterocromatina constitutiva). La conformación de eucromatina o de heterocromatina depende sustancialmente del número de contactos que se establezcan entre los nucleosomas.

Distintos factores epigenéticos, entre ellos: 1. Las modificaciones postrasduccionales de las histonas. 2. La remodelación de la cromatina y 3. La incorporación de las variantes de las histonas, influyen adicionalmente en el contacto entre los nucleosomas³²⁴ (Figura 53).

Se conocen cinco clases de histonas: la H1 o histona de unión y cuatro histonas nucleosómicas (H2A, H2B, H3 y H4), las cuales conforman un octámero de histonas. Las histonas que constituyen el nucleosoma poseen estructura similar: presentan un dominio central globular y un extremo amino-terminal (N-terminal). El domino central contribuye al ensamblaje del octámero que forma el nucleosoma. Los extremos N-terminales (ricos en aminoácidos básicos) ejercen funciones en la replicación y en la transcripción génica. Este hecho obedece a que los extremos N-terminales de las histonas son especialmente vulnerables a múltiples modificaciones covalentes postrasduccionales (merced a la participación de ciertas enzimas), transformando la estructura del nucleosoma y los contactos internucleosomales³²¹.

Existen otras variantes de histonas localizadas en ciertas regiones de la cromatina que alteran las propiedades del nucleosoma y la dinámica de la cromatina. En el "código de histonas", la modificación de los extremos N-terminales de las histonas afecta la interacción con otras proteínas afines a la cromatina^{321,324}. Se ha implicado el código de histonas en diferentes procesos^{297,327}.

13.6.2 Modificación postrasduccional de histonas

Las modificaciones postrasduccionales de las histonas están estrechamente ligadas a la regulación de la transcripción génica, tanto a la activación como a la inactivación de la cromatina (Figuras 49 y 53). Aunque la mayor tasa de modificación de las histonas reside en los extremos N-terminales, también se han referido modificaciones en su porción globular. Se han descrito al menos ocho modificaciones diferentes de histonas en más de 60 aminoácidos diferentes. La modificación covalente de histonas, al igual que la metilación del DNA también es un proceso dinámico y reversible. Estas modificaciones aparecen y desaparecen de la cromatina en cuestión de minutos, dependiendo de las condiciones de señalización en el interior de la célula. A su vez, las histonas que han sido modificadas pueden interrelacionarse entre sí de diversas maneras³²⁵.

La modificación de las histonas constituye un mecanismo epigenético esencial en la programación de la memoria metabólica celular y la perpetuación del fenotipo proinflamatorio de las VSMC en la enfermedad vascular de los pacientes con DM³²⁸. La estructura de la cromatina se modifica a través de diferentes procesos: acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, biotinilación, sumoilación, ribosilación, isomerización y deaminación, entre otros^{325,329} (Figuras 49 y 53):

- 1. Acetilación. La acetilación de las histonas es la modificación covalente de las histonas mejor estudiada. Esta se lleva a cabo sobre los residuos de lisina. Este dinámico proceso se encuentra implicado en la reparación del DNA. Asimismo, se asocia a la transcripción génica, a diferencia de la deacetilación de las histonas que se relaciona con silenciamiento transcripcional³³⁰. Las acetiltransferasas de histonas (HAT) y las HDAC son las enzimas encargadas de la acetilación y la deacetilación de los residuos de lisina. Los HDACi han sido el punto de mira de la elaboración de medicamentos antineoplásicos, ya que revierten las alteraciones epigenéticas en las células cancerosas²⁹⁰. Existe evidencia de que los HDACi logren restaurar la expresión génica en algunas líneas celulares del tejido cardiaco²⁸⁹.
- 2. Metilación. La metilación de las histonas, es una de las modificaciones de las histonas mejor caracterizadas. La metilación de las histonas se lleva a cabo sobre los residuos de lisina y arginina. La histona que presenta mayor tasa de metilación es la H3, seguida de la H4. El proceso de metilación de las histonas se produce en los residuos de lisina (4, 9, 27 y 36) de la histona H3, en la lisina 20 de la H4, en la arginina (2, 8, 17 y 26) de la histona H3 y en la arginina 3 de la histona H4³³¹. A diferencia de la acetilación y la fosforilación de las histonas, la metilación de las histonas es un mecanismo epigenético más estable. La metilación de las histonas se relaciona con diferentes procesos celulares:

 a. La regulación de la transcripción génica. b. La respuesta al daño del material genético.

- 3. Fosforilación. La fosforilación de las histonas está en relación con el control transcripcional y se lleva a cabo sobre los residuos de treonina y serina. La fosforilación es un mecanismo epigenético a través del cual la célula capta los estímulos extracelulares. Este proceso está mediado por diferentes quinasas implicadas en múltiples vías de la señalización celular.
- 4. Ubiquitinación. La ubiquitina representa la fracción protéica que se une de forma covalente a una proteína mediante varios pasos enzimáticos. La ubiquitinación de las histonas las realizan las ubiquitinasas que actúan sobre los residuos de lisina. Esta modificación epigenética interviene sinérgicamente con otras modificaciones de histonas. Su nexo con el estado transcripcional es incierto, ya que se han reportado resultados en ambas direcciones (activación e inactivación transcripcional). La ubiquitinación de las histonas ejerce como vía de señalización celular en el reconocimiento de ciertos factores reguladores³³⁰.
- 5. Biotinilación. La incorporación de biotina a las histonas se realiza mediante una reacción catalizada por dos clases de enzimas, la biotinilasa y la holocarboxilasa sintetasa, que utilizan biotina y ATP (adenosintrifosfato) como sustrato. Se desconocen las implicaciones de la biotinilación en los procesos celulares. Se relaciona con "silenciamiento" transcripcional y la reparación del DNA. Adicionalmente, la biotinilación puede afectar otras modificaciones de histonas.
- 6. Sumoilación. La sumoilación consiste en la incorporación de un grupo SUMO (*Small Ubiquitin Modifier*) de forma covalente a los residuos de lisina de las histonas. Esta modificación postranscripcional puede alterar cualquiera de las histonas que conforman el nucleosoma. La sumoilación se asocia a inhibición transcripcional.
- 7. Ribosilación. Es un mecanismo epigenético implicado en la reparación del DNA. La ribosilación se asocia a activación transcripcional.

- 8. Isomerización. Es una modificación no covalente de las histonas que regula la transcripción génica mediante la metilación de la lisina. La isomerización de los residuos de prolina de las histonas es un proceso reversible en el que intervienen las isomerasas encargadas de la formación de *cis*-prolina y de *trans*-prolina³²⁵.
- 9. Deaminación. Este mecanismo epigenético interrumpe la activación transcripcional mediada por la metilación de los residuos de arginina de las histonas, al ejercer una acción opuesta sobre el proceso de metilación de los residuos de arginina. La deaminación de las histonas se lleva a término en los residuos de arginina, convirtiéndolos a citrulina.

13.6.3 Metiltransferasas de histonas

Las enzimas que catalizan la adición del grupo metil a los residuos de arginina o de lisina de las histonas, se denominan metiltransferasas de histonas (HMT). Las HMT son enzimas específicas que modifican las histonas y utilizan la SAM como fuente donante de grupos metil. Estas proteínas HMT contienen una secuencia particular de 130 aminoácidos que cataliza la metilación de las histonas (dominio SET), de sus siglas en inglés: su(var)3-9, enhancer of zeste, trithorax. Las proteínas del grupo trxG (trithorax) y el PcG (Polycomb) reconocen y trasmiten patrones de la expresión génica heredables a través de mecanismos epigenéticos que aún se desconocen.

Existen dos clases de HMT: 1. Las HMT que metilan los residuos de lisina (K-HMT) y 2. Las HMT que metilan los residuos de arginina (R-HMT), también conocidas como PRMT³²¹.

13.6.4 Desmetilación de histonas

La desmetilación de las histonas las efectúan las enzimas portadoras de dominios desmetilasa. Se conocen dos tipos de dominios que desmetilan lisina en las histonas. De otro lado, no se han identificado enzimas que desmetilen los residuos de arginina de las histonas. Progresivamente se vienen caracterizando diversas desmetilasas de las

histonas. Se presume que las desmetilasas de las histonas están involucradas en la expresión génica, en el desarrollo del organismo y en la diferenciación celular³³².

13.7 RNAs no codificantes

Los RNAs desempeñan una función substancial en la expresión génica. Los RNAs protegen a la célula de diversas agresiones como la infección viral y la incorporación de transposones en el genoma, ya que los transposones interrumpen la transcripción génica. Se han identificado tres clases principales de RNAs: 1. El siRNA (descubierto por Fire y Mello)²⁸². La introducción de RNA anti sentido en la célula, interrumpe la expresión génica. 2. Los piRNAs (*piwi-interacting* RNAs) que derivan su nombre por interactuar con las proteínas *Piwi*. Los piRNAs desempeñan una labor esencial en la inactivación de los transposones de las células germinales. 3. Los miRNAs, que son pequeñas moléculas de RNA de doble hebra que actúan a nivel postrasduccional como reguladores de la expresión de numerosos genes. Los miRNAs se encuentran involucrados en funciones celulares básicas²⁹¹. La expresión de los miRNAs es específica de cada tejido y de cada enfermedad³³³. Paulatinamente se vienen identificando diferentes miRNAs representativos de cada una de las ECV³³³⁻³³⁵ (Figura 49).

13.8 Epigenética y enfermedades complejas

Actualmente una de las prioridades en la medicina occidental está representada por el avance en el discernimiento de las enfermedades complejas con creciente prevalencia como la ATS, la HTA, la obesidad, la DM tipo 2, el síndrome metabólico y las ECV (EC)⁴⁹, entre otras nosologías (neoplásicas, metabólicas y psiguiátricas)^{336,337}.

Inicialmente, el estudio de estas enfermedades se cimentó en la búsqueda de genes afines a su etiopatogenia. Sin embargo, en algunos casos no se encontraron alteraciones genéticas que las explicasen, ni se demostraron patrones de herencia mendeliana. Como consecuencia de ello, no se logró implicar algunos genes en la etiopatogenia de ciertas enfermedades⁵⁷.

Se presume que los fenómenos epigenéticos explican la actual epidemia de ECV, ya que en los humanos los cambios genéticos (mediante mutaciones clásicas o a través de los SNPs) no suceden tan rápidamente. Asimismo, los fenómenos epigenéticos explicarían (al menos parcialmente), el acusado incremento de las enfermedades afines al proceso de envejecimiento. La epigenómica se ha constituido en una herramienta imprescindible en el estudio de las enfermedades complejas^{286,296} (Figura 54).

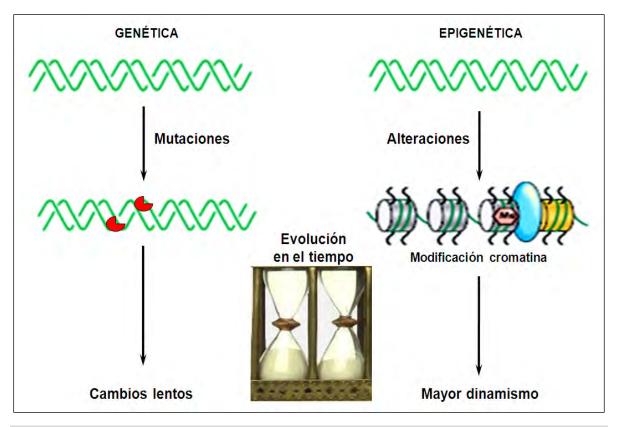


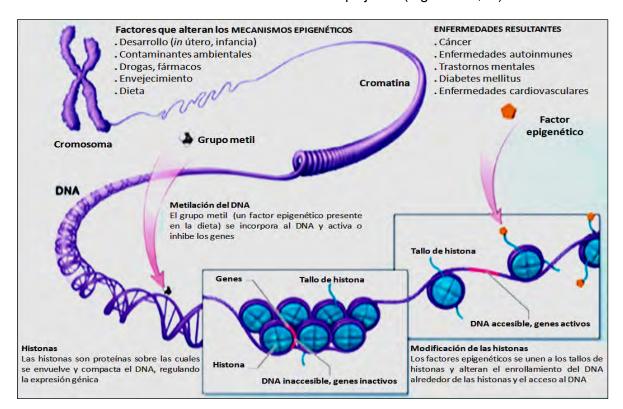
Figura 54. Genoma, epigenoma y evolución de la información genética en el tiempo. En las diferentes especies, los cambios genéticos suceden paulatinamente mediante mutaciones. De otro lado, los cambios epigenéticos que ocurren en el DNA y en las histonas son más dinámicos, influyendo más acusadamente en el ciclo vital de las células. Modificada de: *Epigenetic?. The Epigenome Network of Excellence. 2006. copyright* © *Epigenome NoE*¹³⁴.

Los factores epigenéticos se consideran candidatos etiológicos a las enfermedades complejas, merced a cuatro hechos fundamentales^{49,338}:

1. El dinamismo del estado epigenético de los genes (epigenoma), en comparación con el secuenciamiento del DNA (genoma), ya que el epigenoma se ve afectado por

diferentes aspectos del desarrollo y del entorno al que está expuesto continuamente el organismo³⁰⁵.

- 2. Algunos rasgos epigenéticos pueden transmitirse simultáneamente con el secuenciamiento del DNA a través de varias generaciones celulares (herencia transgeneracional no genómica)¹³⁹.
- 3. La modulación epigenética es crítica en el funcionamiento del genoma, en procesos como: a. La segregación de los cromosomas en la mitosis. b. La inactivación de los transposones. c. La regulación de la actividad génica.
- 4. La estabilidad de las modificaciones epigenéticas explican algunos patrones de herencia no mendeliana de las enfermedades complejas³³⁹ (Figuras 54,55).



Figuras 55. Mecanismos epigenéticos y enfermedades complejas. Los factores epigenéticos son candidatos etiológicos a la génesis de las enfermedades complejas. Diferentes aspectos del desarrollo y del entorno alteran el epigenoma. Adaptada de Bethesda (MD): *Epigenomics Scientific Background. National Center for Biotechnology Information (US); 2010²⁹¹.*

13.8.1 Alteraciones de la impronta genómica y enfermedades complejas

La impronta genómica hace alusión a un tipo de heredabilidad no mendeliana de los alelos. Las variaciones en el grado de metilación del DNA de los alelos es una característica básica de las regiones de impronta genómica. Esto significa que existen marcas epigenéticas en algunos locus basadas en el origen del alelo de alguno de los progenitores, lo que resulta en una expresión genética monoalélica diferenciada. Esta expresión diferenciada se presenta durante las diferentes etapas del desarrollo en todas las células y en ciertos tejidos³⁴⁰. No obstante, los genes de la impronta genómica también ejercen funciones en el desarrollo posnatal¹⁹⁵.

La pérdida (o alteración) de la impronta (*imprinting*) genómica (LOI) ha permitido comprender diversas enfermedades³⁴¹. La DM y la obesidad (dos pilares fundamentales del síndrome metabólico), se asocian a alteraciones de la impronta genómica³⁴² (Tabla 13).

Tabla 13. Enfermedades asociadas a pérdida de la impronta genómica

Síndrome de Angelman 134,341

Síndrome de Beckwith-Wiedemann 134,343

Síndrome de Prader-Willi 134,344

Enfermedad de Albright³⁴⁴

Diabetes Mellitus neonatal transitoria³⁴⁴

Obesidad³⁴²

Diabetes Mellitus³⁴²

Se conocen más de 200 genes improntados en los mamíferos y su número sigue en aumento 134,138,139.

14. Epigénesis, homocisteína y aterosclerosis

Diversos estudios han sugerido la influencia de ciertos fenómenos epigenéticos en la aterogénesis. El incremento de Hcy se asocia a hipometilación del DNA, lo que pudiera establecer su nexo con la enfermedad aterosclerótica³⁴⁵. A su vez, la concentración de Hcy se relaciona de forma gradual e independiente con el riesgo cardiovascular.

La Hcy se encuentra determinada entre otros factores, por el polimorfismo C677T del gen que codifica la enzima MTHFR³⁴⁶ y por la enzima PON^{20,21}, debido a su capacidad para hidrolizar diferentes lactonas, entre ellas, la Hcy-T. La actividad PON difiere en virtud

de los polimorfismos del gen PON1. Los portadores de los alelos R192 y L55 PON1 presentan mayor actividad tiolactonasa que los individuos que portan los alelos Q192 y M55. Jakubowski y cols.²⁰, han señalado que la disminución de la actividad lactonasa constituye un FRECV en las personas con HHcv.

En la génesis de las ECV y particularmente en la formación de la placa de ateroma, más que las mutaciones genéticas, es la modificación de la expresión de ciertos genes lo que establece su evolución⁵⁵. La heredabilidad de los determinantes de la susceptibilidad condiciona el desarrollo de las ECV y en parte, la evolución de la placa ateromatosa³⁴⁷. Sin embargo, al margen de estos enunciados, los fenómenos genéticos "no heredados" (epigenéticos) alteran la información genética.

Hemos señalado la importancia de la influencia prenatal como determinante adicional del riesgo cardiovascular^{348,349}. La dieta materna condiciona parcialmente la susceptibilidad cardiovascular de la descendencia y de las siguientes generaciones, con independencia de las alteraciones orgánicas y/o de las mutaciones³⁴⁹. Una segunda aportación epigenética imprescindible acontece en los adultos como consecuencia de la Hcy³⁵⁰, al modificar la estructura del DNA¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

Las alteraciones epigenéticas mejor estudiadas se generan por adición de grupos metil al DNA y a las histonas. Un proceso dependiente de la actividad de las DNMT y de la dieta³⁵¹. La dieta condiciona el aporte de donantes de grupos metil al metabolismo celular, a través de ciertos alimentos, especialmente de aquellos nutrientes con alto contenido en acido fólico, vitamina B₁₂, colina, betaína y Met. Luego, la dieta aporta alimentos con alto o bajo contenido en grupos metil³⁵².

La relación entre la concentración de Hcy, ácido fólico y el estado de la metilación celular es inversa¹⁹⁴. Por consiguiente, aparte de considerar las alteraciones genéticas que afectan la actividad de las DNMT, debemos tener presente que las DNMT utilizan SAM

Relevancia de polimorfismos génicos y la S-homocisteína en la epigénesis en arteria mamaria interna y aorta (como donante de grupos metil), en el proceso de metilación de los residuos de citosina de los dinucleótidos CpG.

Adicionalmente a su importancia en cancerología, en donde la metilación ha sido estudiada en profundidad^{287,353}, existe creciente interés en el estudio de los fenómenos de hipopometilación e hipermetilación en el proceso aterogénico²⁸⁵. Diferentes observaciones involucran la HHcy en ambos fenómenos, ya que la HHcy disminuye la SAM⁷³.

La SAM constituye un intermediario esencial en la metilación del DNA¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ y en la síntesis del 5-MTHF a través de la enzima MTHFR³⁵⁰ (Figuras 25 y 26). El polimorfismo C677T MTHFR es un determinante genético de la concentración de Hcy³⁴⁶. Dicho polimorfismo se asocia a hipometilación del DNA^{197,354}. Diferentes investigadores han encontrado asociación entre HHcy, metilación del DNA y aterogénesis, en relación con factores ambientales y nutricionales³⁵⁵.

Otros investigadores han reportado hipometilación e hipermetilación en las lesiones ateroscleróticas en condiciones de normocisteinemia^{350,356}, subrayando que en las fases iniciales del proceso aterosclerótico, los factores nutricionales afectan el grado de metilación del DNA con independencia de la concentración de Hcy.

14.1 S-adenosil-homocisteína, metilación y aterogénesis

Se ha sugerido que la toxicidad de la Hcy obedece al incremento de la SAH¹⁶⁶. La Hcy aumenta la SAH. La SAH es crucial en las reacciones de transmetilación celular, ya que inhibe las DNMT³⁵⁷⁻³⁵⁹. El aumento intracelular de la SAH se asocia a hipometilación del DNA¹⁹⁶ y a disfunción endotelial. Adicionalmente, el aumento de la SAH se asocia a enfermedad vascular²³. Por consiguiente, se cree que el incremento de la SAH explicaría indirectamente la toxicidad de la Hcy (Figura 26).

La HHcy incrementa la SAH, modificando el grado de metilación del DNA y la expresión de diversos genes proaterogénicos^{360,361}. Sharma y cols.⁷³, reportaron 135 genes (descritos en la literatura hasta noviembre de 2004) que regulan la concentración de

Hcy o que son modulados por la HHcy. Sin embargo, el número de genes implicados en dicho proceso aumenta constantemente.

La Hcy (>75 μmol/l) se asocia a hipometilación del DNA y ATS³⁴⁵. En estas circunstancias, la SAH compite con la SAM por el sitio de unión con las DNMT, interfiriendo con la metilación del DNA¹⁶. Por este motivo, la SAH viene adquiriendo especial relevancia, como marcador del riesgo cardiovascular, quizás de forma más acusada que la Hcy *per se*^{357,358} (Figura 26).

14.2 Metilación, células musculares lisas de los vasos sanguíneos y aterosclerosis

Los fenómenos epigenéticos ejercen efectos cruciales sobre el repertorio de genes involucrados en la formación de la MEC, la respuesta inflamatoria y la proliferación celular, procesos estos implicados en la aterogénesis^{285,360}.

Los factores epigenéticos contribuyen al proceso aterogénico al favorecer la proliferación policional de las VSMC. Debido a que las VSMC constituyen la mayor proporción de la masa celular de la pared arterial, los cambios epigenéticos en las lesiones ateroscleróticas han sido descritos fundamentalmente en estas células.

En la ATS, las VSMC presentan fenotipo proliferativo, contrariamente a lo que sucede en las células endoteliales²⁸⁵. Si bien la HHcy induce hipometilación global del DNA³⁶¹, algunos genes se encuentran hipermetilados en las VSMC, lo que no sucede en las células endoteliales³⁶². Estos efectos dualísticos de la regulación epigenética en la expresión génica, reflejan la complejidad de la ATS (Tabla 14 y figura 56).

Funcionalmente los genes eNOS e iNOS se encuentran hipometilados en las células del endotelio vascular. En cambio, en las VSMC³²⁷ y en otros tipos celulares³⁶⁴, estos genes se hallan hipermetilados. El gen iNOS no se expresa en la mayoría de los tejidos (ya que se encuentra hipermetilado)³⁶⁴, pero se expresa en la neoíntima de las placas ateroscleróticas^{365,366} (Tabla 14 y figura 56).

Tabla 14. Genes involucrados en la aterosclerosis y regulados por mecanismos epigenéticos*285

Gen	Diana	Mecanismo
eNOS	Endotelio	Metilación DNA y CH ^{327,363}
iNOS	Inflamación, macrófagos	Metilación DNA y CH ³⁶⁴⁻³⁶⁶
Fads2	Aumenta la patogénesis de la HHcy	Metilación DNA ³⁶⁷
c-fos	Estrés de cizallamiento	CH
ERα	Tejido cardiovascular aterosclerótico	Metilación DNA
ERβ	Tejido cardiovascular aterosclerótico	Metilación DNA
P66Shc	Insuficiencia renal crónica terminal	Metilación DNA
15-LO	Aterogénesis	Metilación DNA
EC-SOD	Aterogénesis	Metilación DNA
H19/igH2	Regulado por la HHcy	Imprinting
MMp-2	Matriz extracelular	Metilación DNA
MMP-7	Matriz extracelular	Metilación DNA
MMP-9	Matriz extracelular	Metilación DNA
TIMP-3	Matriz extracelular	Metilación DNA
INF-γ	Respuesta inflamatoria	Metilación DNA
PDGF-A	Proliferación celular	Metilación DNA
ICAM-1	Reacciones inflamatorias	Metilación DNA
P53	Apoptosis	Metilación DNA

*Esta información se está renovando permanentemente; HHcy (hiperhomocisteinemia) eNOS; (sintasa endotelial del óxido nítrico); iNOS (sintasa inducible del óxido nítrico); Fads2 (fatty acid desaturase 2); c-fos (proto-oncogén celular perteneciente a la familia de factores de transcripción de genes de expresión rápida); ERα (receptor de estrógenos α); ERβ (receptor de estrógenos β); P66Shc (66 kilodalton isoform of the growth factor adapter Shc-age related gene); 15-LO (15-lipooxigenasa); EC-SOD (extracelular superoxide dismutase); CH (código de histonas); H19/igH2 (imprinted maternally expressed transcript non-protein coding/insulin-like growth factor II); MMP (genes del clúster de las metaloproteinasas de la matriz extracelular); TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3); INF-γ (interferon γ); PDGF-A (human platelet-derived growth factor alpha chain); ICAM-1 (moléculas de adhesión intercelular 1); p53 o tp 53 (fosfoproteína 53 o tumor proteína 53). Modificada de: Turunen MP, et al. Review. Biochem Biophys Act. 2009;1790:886-891²⁸⁵.

Se ha descrito ausencia de islas CpG en el gen iNOS, aunque se ha indicado la presencia de ciertos dímeros CpG en el promotor del gen que presentan potencial de metilación. La metilación del promotor del gen iNOS altera su expresión¹⁷. Chan y cols.³⁶⁴, mostraron que los DMR se encuentran localizados en la región proximal del promotor del gen iNOS. Asimismo, la metilación de los residuos de citosina inhibe la transcripción del gen iNOS³⁶⁸. Se cree que existen mecanismos adicionales que alteran la expresión del gen iNOS (en relación con la Hcy), más que un efecto directo de la Hcy sobre la metilación de los dímeros CpG del promotor del gen iNOS. De esta manera se ha explicado que la Hcy activa la respuesta inflamatoria en la pared vascular al incrementar la expresión de

citocinas proinflamatorias³⁶⁹, además de disminuir la biodisponibilidad de NO⁻³⁷⁰ e incrementar la producción de ROS en las células endoteliales y en las VSMC³⁷¹.

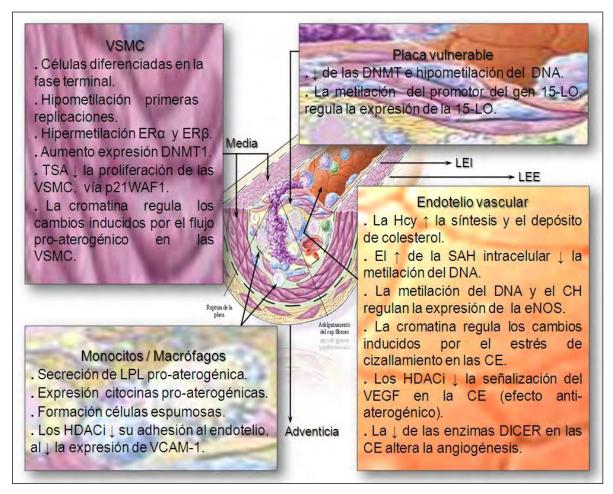


Figura 56. Epigénesis, aterosclerosis y la pared de los vasos sanguíneos. Los factores epigenéticos ejercen efectos decisivos sobre los genes implicados en la formación de la matriz extracelular (MEC), la inflamación y la proliferación celular, procesos estos implicados en la aterosclerosis. Estos factores contribuyen al proceso aterogénico, al favorecer la proliferación policlonal de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos (VSMC). El TSA inhibe las deacetilasas de histonas (HDAC) y la proliferación de las VSMC, activando el p21WAF1 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1*). ER α (receptor α de estrógenos); ERβ (receptor β de estrógenos); DNMT (metiltransferasas del DNA); DNMT1 (DNA metiltransferasa 1); TSA (*trichostatin/*tricostatin A); VCAM-1 (moléculas de adhesión de las células vasculares 1); DNA (ácido desoxiribonucléico); 15-LO (gen de la 15-lipooxigenasa); Hcy (homocisteína); SAH (S-adenosil-homocisteína); CE (células endoteliales); CH (código de histonas); eNOS (sintasa endotelial del óxido nítrico); iHDAC (inhibidores de las deacetilasas de la histonas); VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular); *DICER* (endoribonucleasa perteneciente a la familia de la RNAasa III presente en el citoplasma de las células); RNAasa III (polimerasa III del ácido ribonucléico). Adaptada de: *Turunen MP*, *et al. Biochem Biophys Act.* 2009;1790:886-891²⁸⁵.

14.2.1 Hipometilación del DNA

Jiang y cols.³⁷², reportaron que la Hcy inducía hipometilación del DNA (de forma similar a como sucede en los tejidos neoplásicos) y alteración de las DNMT, relacionando

la hipometilación del DNA y la aterogénesis. Se ha reportado hipometilación del DNA en diferentes procesos afines: ATS³⁷², envejecimiento^{373,374}, crecimiento tumoral³⁷⁴ e HHcy³⁴⁵.

En la fase proliferativa de la ATS, la hipometilación del DNA es un hallazgo constante en las placas de ateroma, encontrándose hipometilación en ~ 9% de la citosina de los humanos³⁰⁸ y en los animales de experimentación^{308,356}. En los ratones KO ApoE-/- la hipometilación del DNA precede los hallazgos histológicos de la ATS³⁵⁶. En la ATS avanzada, la magnitud de la pérdida del grupo metil del DNA en las células endoteliales se corresponde con la concentración de Hcy³⁶¹ y con el incremento intracelular de SAH¹⁹⁶. Se hace alusión a que la pérdida de metilación del DNA es pasiva o activa, cuando la hipometilación del DNA es dependiente o no de la replicación del DNA, respectivamente³¹⁰. Se desconoce cual de estos dos procesos prevalece en la ATS. Si bien, se presume que la hipometilación pasiva del DNA sea el proceso predominante en la ATS, debido al incremento en la replicación de las VSMC en la neoíntima de los vasos sanguíneos ateroscleróticos²⁸⁵.

Adicionalmente a la hipometilación del DNA y a la mayor proliferación de las VSMC en la ATS, existe alteración de la reparación de las diferentes macromoléculas (DNA, RNA, proteínas) y estimulación de los factores del crecimiento^{375,376} (Tabla 14 y figura 56).

14.2.2 Hipermetilación del DNA

La hipermetilación de las islas CpG del promotor de ciertos genes es propia del silenciamiento transcripcional, aunque se desconoce su relevancia en las enfermedades diferentes al cáncer²⁸⁵. Los genes eNOS³²⁷, iNOs³⁷⁷, FGF₂ (*fibroblast growth factor-2*)³⁵⁵ y el promotor del gen del receptor de estrógenos α (ER α)²⁸⁵, se encuentran hipermetilados en las VSMC. El gen ER α y el gen del receptor de estrógenos β (ER β) están implicados en la proliferación de las VSMC. No obstante, se desconoce la acción de los receptores de estrógenos *in vivo*. A lo largo del proceso de envejecimiento, concurre hipometilación global del DNA del genoma. Si bien existe hipermetilación de algunos genes involucrados

en la aterogénesis como el ER α y el gen de la 15-lipooxigenasa (15-LO), entre otros genes²⁸⁵ (Tabla 14 y figura 56).

14.3 S-adenosil-homocisteína, metilación, homocisteína y aterosclerosis

Llegados a este punto, es imprescindible diferenciar el nexo existente entre el grado de metilación del DNA y la enfermedad aterosclerótica, *versus* la relación existente entre HHcy y ATS, que no deben equipararse¹⁵¹. Cuando coexiste HHcy, aumento de la SAH y alteración de la relación SAM/SAH (la denominada metilación potencial), el grado de metilación del DNA puede estar o no afectado. Más aún, se han descrito en la literatura casos de deficiencia de la SAHh e incremento en la concentración de SAH con niveles de Hcy en rangos fisiológicos^{23,378}. Por consiguiente, el incremento de SAH no siempre se traduce en hipometilación del DNA¹⁵¹.

La Hcy a través de la SAH, es un determinante de la metilación del DNA, pero no el único. Existen varios factores que regulan este importante fenómeno de la función celular, ya que el grado de metilación del DNA depende adicionalmente de: 1. La velocidad del crecimiento celular. 2. De la duplicación del DNA. 3. De la arquitectura y la densidad de la cromatina. 4. Del grado de diferenciación celular y tisular (en los genes de impronta genómica) y 5. De la concentración de SAM *in situ*.

Los elementos involucrados en este puzle, están representados por: 1. La Hcy. 2. La SAH. 3. El grado de metilación del DNA y 4. La ATS. La HHcy aumenta la SAH. La SAH inhibe las DNMT. La HHcy se asocia a la ATS. A su vez, el incremento de SAH y la hipometilación del DNA se asocian a la ATS. Sin embargo, la ATS puede desarrollarse con independencia del incremento de Hcy o de SAH. Como complemento a la complejidad de esta trama, el aporte de folatos modifica todos los elementos del puzle¹⁵¹. Aparte de ello, desconocemos diversos componentes imprescindibles en el engranaje de este puzle (Figura 25).

14.4 Epigénesis, gen eNOS y homocisteína

Entre los factores implicados en la expresión del gen eNOS, los mecanismos epigenéticos merecen especial atención³²⁷. La hipometilación del promotor del gen eNOS, favorece su expresión constitutiva en las células endoteliales³⁶³. La HHcy altera la expresión del gen eNOS de diferentes formas: 1. Mediante la fosforilación de la eNOS, a través de la vía de la proteína cinasa C (PKC)³⁷⁹. 2. Incrementando la producción de ROS.

3. Aumentando la transcripción de los genes noxa (favorecen la acción de las caspasas y la apoptosis) y p53 (fosfoproteína 53 o tumor proteína 53), entre otros genes, disminuyendo la biodisponibilidad de NO*. Las caspasas (*caspases o cysteine-aspartic proteases/cysteine-dependent aspartate-directed proteases*), son una familia de proteasas dependientes de cisteína que desempeñan una acción fundamental en la inflamación, la necrosis y la apoptosis³⁶³.

14.5 Epigénesis, eNOS, homocisteína y gen DDAH2

La metilación del DNA se asocia a diferentes patologías relacionadas con el metabolismo de la Hcy. Se presume que este mecanismo epigenético esté involucrado en la disfunción de la eNOS, como consecuencia del incremento del estrés oxidativo promovido por la HHcy. Sin embargo, el promotor del gen eNOS carece de islas CpG. Este hecho sugiere que la disfunción de la eNOS, no está relacionada con el grado de metilación del promotor del gen eNOS. Por esta razón, se ha propuesto la vía DDAH/ADMA/NOS/NO* como explicación a la alteración de la eNOS mediada por la metilación del DNA secundaria a la HHcy²⁵.

En los ratones, la metilación del DNA y la acetilación de las histonas en el promotor del gen DDAH2 regulan la transcripción génica. El promotor del gen DDAH posee gran cantidad de grupos CG, lo que le confiere particular vulnerabilidad a la metilación *de novo* del DNA²⁵.

Zhang y cols.²⁵, sugirieron que la disfunción de la eNOS en presencia de HHcy, obedecía a la modificación del grado de metilación del promotor del gen DDAH. Estos investigadores, encontraron en estudios *in vitro*, que la HHcy (10-30 μmol/L) se relacionaba con hipometilación e incremento en la transcripción del mRNA del gen DDAH2, mientras que la HHcy (100-300 μmol/L) ocasionaba hipermetilación de las islas CpG del promotor del gen DDAH2 e inhibición de la transcripción del mRNA. De otro lado, el incremento plasmático gradual de Hcy y ADMA disminuye la expresión del gen DDAH2 en las células endoteliales, reduciendo a su vez la actividad de la eNOS y la producción de NO¹. Debido a que la ADMA inhibe las NOS, el incremento de ADMA altera el endotelio vascular. Del mismo modo, la disminución de la actividad de las DDAH aumenta la concentración de ADMA^{276,380}, alterando la eNOS y las vías transcripcionales de la señalización *redox* (aumentando el estrés oxidativo y la producción de superóxidos)^{381,382}. Zhang y cols.²⁵, sugirieron que la alteración de la vía DDAH/ADMA/NOS/NO¹ revela que la disfunción de la eNOS promovida por la HHcy obedece al menos en parte, a la modificación del grado de metilación del promotor del gen DDAH2.

15. Arteria mamaria interna y aterosclerosis

15.1 Conceptos anatómicos y fisiopatológicos

La AMI es una arteria elástica de origen mesenquimatoso³⁸³, localizada en el interior de la cavidad torácica. Anatómica y fisiológicamente la AMI yace a sendos lados del esternón, aportando flujo sanguíneo a la pared torácica, a la glándula mamaria, al hombro y al brazo. En el 98% de los humanos, la AMI se origina de la superficie antero-inferior de la primera porción de la arteria subclavia, siendo la AMI su primera rama descendente. En el 1-2% de las personas, la AMI emerge de la tercera porción de la arteria subclavia. La AMI discurre medialmente y hacia abajo hasta entrar en el tórax detrás del primer cartílago costal, situándose a una distancia de 1.5-2 centímetros del borde lateral del esternón. En

el 50% de los casos, la AMI se bifurca a la altura del sexto cartílago intercostal. En el 50% restante, la AMI se divide un espacio intercostal por encima o por abajo. Un detalle de relevancia quirúrgica consiste en la bifurcación alta de la AMI, a nivel del tercer o cuarto cartílago costal (2% de los casos). Las ramas terminales de la AMI están representadas por la arteria musculofrénica y la arteria epigástrica superior (Figura 57).

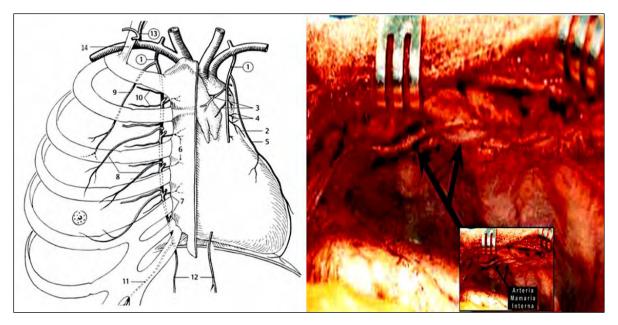


Figure 57. Anatomía de la arteria mamaria interna. Izquierda. Recorrido de la arteria mamaria interna (AMI) y sus diferentes ramificaciones, en relación con el corazón y demás estructuras anatómicas. Gráfica adaptada de: Feneis H. Dauber W. Pocket atlas of human anatomy. 2000. 4th edition. Leipzig, Germany. Thieme publishers. Derecha. Imagen anatómica de la AMI izquierda. Perspectiva desde la posición del cirujano. Modificada de: Levinson MM. Learning Center: The Internal Mammary Artery. The Heart Surgery Forum: a cardiothoracic multimedia journal. R (ramas); A (arteria); AMI (1); R. Mediastinales (2); R. Tímicas (3); R. Bronquiales (4); A. Pericardiofrénica (5); R. Esternales laterales (6); R. Perforantes (7); R. Mamarias mediales (8); R. Costales laterales (9); R. Intercostales anteriores (10); A. Musculofrénica (11); A. Epigástrica superior (12); Tronco Tirocervicoescapular/Tirocervical (13); Musculo Escaleno anterior (14).

Por motivos que desconocemos, la AMI es notablemente resistente al desarrollo de ATS³⁸⁴, incluso a algunos FRECV (DM, tabaquismo, DLP)³⁸⁵⁻³⁸⁷, aunque no es completamente inmune a estos FR (HTA maligna), ni al proceso aterosclerótico³⁸⁷⁻³⁸⁹. Durante la CRC, los injertos de AMI, excepcionalmente se consideran inaceptables por la presencia de placas ateroscleróticas³⁸⁶⁻³⁸⁸. Si bien, la susceptibilidad de la AMI a la ATS es variable³⁸⁸⁻³⁹¹. En las personas que presentan EC y enfermedad vascular periférica concomitante, la incidencia de ATS de la AMI es relativamente baja (2%), al igual que en

los pacientes de la tercera edad³⁸⁷. Cuando la AMI hace parte del proceso aterosclerótico, generalmente evidencia compromiso segmentario, principalmente en sus porciones proximal y/o distal, cerca de su bifurcación^{386,388} (Figura 58).

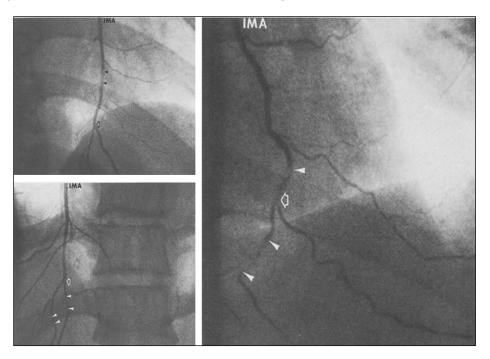


Figura 58. Angiografía de la arteria mamaria interna. Imagen superior izquierda. Porción distal de la IMA (*internal mammary artery*) izquierda, la cual evidencia enfermedad segmentaria antes de su bifurcación (flechas). Imagen inferior izquierda. Enfermedad estenosante de las ramas terminales del segmento distal de la IMA derecha por debajo de su bifurcación (flechas). Imagen Derecha. Segmento distal de la IMA izquierda que muestra lesiones por encima y por debajo de la bifurcación (flechas). Modificada de: *Essalat M, et al. Act Med Iran. 2003; 41(3):189-193*³⁸⁸.

Se han descrito diferentes fenotipos de las VSMC en la misma estructura de la AMI³⁹⁰. Se entiende que este hallazgo guarda relación con la transición morfológica de sus fibras elásticas hacia la capa muscular (desde su segmento proximal al distal) a lo largo de la AMI. Se presume que diferentes factores extrínsecos como: la distensión axial, el estrés de cizallamiento de las paredes de la AMI, la escasez y/o la insuficiencia de sus ramas colaterales, pudiesen contribuir a explicar las diferencias locales de la susceptibilidad de la AMI a la ATS³⁹².

Los vasos sanguíneos humanos varían en su predisposición a la aterogénesis^{6,393-399}. La incidencia de ATS es ostensiblemente mayor en las arterias coronarias que en la AMI (relación 10:1) y en otras arterias del organismo, siendo el compromiso aterosclerótico de

la AMI, un hallazgo excepcional en las necropsias³⁹⁹. En estudios *post mortem* realizados en nonagenarios, menos del 10% evidencian ATS en la AMI, a diferencia de las arterias coronarias y de otros lechos vasculares en los que la ATS es el denominador común.

Las VSMC de la AMI son células de origen mesodérmico (mesenguimatosas), a diferencia de las VSMC de la arteria carótida y de la aorta que son células de origen mesoectodérmico, ya que se derivan de las células de la cresta neural (CCN)³⁸³. De otro lado, las VSMC de las arterias coronarias proceden embriológicamente de un tipo especial de epitelio⁴⁰⁰ (mesotelio seroso) y de las CCN³⁸³. Las CCN presentan acusada limitación de su capacidad antioxidante (actividad catalasa), lo que las torna más vulnerables a la oxidación de las LDL. Se ha sugerido que este hallazgo contribuye a explicar la mayor susceptibilidad de la carótida y de las arterias coronarias a la ATS⁴⁰¹. Se han planteado algunas hipótesis para explicar la inmunidad de la AMI a la ATS (Tabla 15).

Tabla 15. Explicaciones propuestas a la resistencia de la arteria mamaria interna a la aterosclerosis

Origen embrionario (mesodérmico) de las VSMC de la AMI³⁸³

Composición estructural de la pared de la AMI^{392-394,402-405}

Heterogenicidad de los fenotipos existentes en las VSMC de la AMI^{390,395}

Mayor actividad endotelial de la AMI^{12,406}

Incremento en la concentración tisular en la AMI de la eNOS, de la ECA y del receptor de la ET-A¹²

Menor migración celular y menor oxidación de las LDL⁴⁰²

Mayor capacidad antioxidante y de activación de las NOS de las VSMC402

Diferencia en la expresión de genes protrombóticos (TF y tPA) en las VSMC⁴⁰⁷

Diferencia en la expresión génica ateroprotectora y proaterogénica en el territorio vascular⁷

Mayor expresión de genes que regulan la proliferación celular y la apoptosis (1)394,408 Menor expresión de decorina y tenascina (2)395

Mayor resistencia tisular a la infección⁴⁰⁹

Fenotipo de las CE menos prono al envejecimiento celular y mejor funcionabilidad telomérica 410-414

Mayor plasticidad homeostática de la AMI, modulada a través de la expresión génica diferenciada y regulada por mecanismos epigenéticos (metilación tejido-específica) [Ésta Tesis Doctoral]

AMI (arteria mamaria interna); VSMC (células musculares lisas de los vasos sanguíneos); eNOS (sintasa endotelial del óxido nítrico); NOS (sintasas del óxido nítrico); ECA (enzima convertidora de angiotensina); ET-A (endotelina A); LDL (lipoproteínas de baja densidad; TF (factor tisular); t-PA (activador del plasminógeno tisular) ;⁽¹⁾Protegiendo la AMI contra la trombosis y el remodelamiento vascular; ⁽²⁾Vinculadas funcionalmente a la actividad de las LDL y a la migración de las VSMC.

16. Cirugía de revascularización coronaria

What has been accomplished does not die, but too often, alas, the personality of those who have handed the torch from one generation to another soon fades into oblivion.

Harvey Williams Cushing (1869-1939)⁴¹⁵.

16.1 Breve reseña histórica

La primera derivación aortocoronaria a nivel experimental fue realizada por Alexis Carrel en 1910⁴¹⁶. Los principales hitos en el desarrollo de la CRC se reflejan en la tabla 16⁴¹⁶⁻⁴²⁷. En 1960, Kolesov utilizó la AMI en la CRC sin ayuda de la arteriografía coronaria, ni del *bypass* cardiopulmonar (BCP)⁴²⁰⁻⁴²² (Figura 59).

Tabla 16. Principales momentos históricos de la cirugía de revascularización coronaria

Carrel, realizó la primera derivación aorto-coronaria experimental⁴¹⁶ Beck, desarrolló la revascularización miocárdica indirecta mediante injertos pediculados de grasa 1935 pericárdica, epiplón y músculo pectoral suturadas al miocardio isquémico⁴¹ Vineberg, implantó la AMI pediculada al miocardio ventricular⁴¹⁸ 1946 Longmire, inició la revascularización miocárdica directa realizando endarterectomía coronaria 419 1958 Kolesov, utilizó la AMI en la CRC sin ayuda del bypass cardiopulmonar (BCP)(1)420-422 1960 Effler, realizó la primera angioplastia coronaria quirúrgica con parche de pericardio 423,424 1962 Favaloro, efectuó la primera derivación aorto-coronaria con vena safena invertida^{425,426} 1967 Green, publicó la primera serie de pacientes en los que se suturó la AMI al lecho coronario 1968

CRC (cirugía de revascularización coronaria); AMI (arteria mamaria interna). Modificada de: Alonso JJ, et al. Rev Esp Cardiol. 2000;53(2):241-266⁴²⁸. ⁽¹⁾AI margen inferior de la tabla, se refleja escuetamente la trascendencia de las aportaciones de Kolesov a las técnicas actuales de la CRC⁴²¹ (Figura 59).

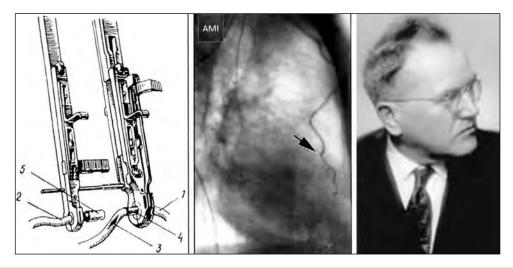


Figura 59. Vasilii Ivanovich Kolesov. Izquierda. Stapler vascular utilizado por Vasilii I. Kolesov (1904-1992) y Evgenii V. Kolesov en la cirugía de revascularización coronaria (CRC) sin circulación extracorpórea (CEC). 1 (arteria coronaria); 2 (AMI); 3 (incisión en la arteria coronaria); Centro. Angiografía coronaria posquirúrgica. Derecha. Kolesov en la década de los 60 cuando realizó la primera CRC sin CEC. AMI (arteria mamaria interna). Vasilii I. Kolesov: "was one of the pioneers of cardiovascular surgery. He is often referred to as the surgeon who performed the first successful coronary artery bypass operation. Kolesov was the first to successfully apply the suture technique to clinical coronary artery bypass surgery. He was also the first—and remains the only— surgeon to use coronary stapling clinically. Recent rapid development in robotic and video-assisted coronary surgery has revived interest in Kolesov's original work on coronary stapling and off-pump coronary surgery. However, little is known about the personality of Dr. Kolesov, his early work that led to his pioneering effort and the circumstances under which his work was done"

Igor E. Konstantinov⁴²¹.

No obstante, el inicio de la revascularización miocárdica tal como la conocemos hoy, se produjo en 1967, cuando el Dr. Rene Favaloro realizó el primer injerto aortocoronario^{425,426} (Figura 60). Poco después, Green y cols.⁴²⁷, publicaron en 1968 la primera serie de pacientes en los que se realizó la anastomosis de la AMI a la arteria coronaria nativa.

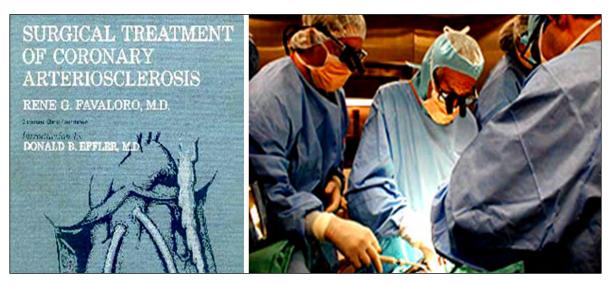


Figura 60. René Gerónimo Favaloro y Donald Brian Effler. Izquierda. Portada del libro: Surgical Treatment of Coronary Arteriosclerosis, publicado por Favaloro (1923-2000) y Effler (1915-2004) en 1970. Texto editado también en español. Derecha. René Favaloro en cirugía (Fundación Favaloro, junio 2000). Imágenes reproducidas de: Museo Virtual René Gerónimo Favaloro.

http://www.fundacionfavaloro.org/museo legado cientifico.html.

16.2 Conceptos generales

La CRC es una de las intervenciones quirúrgicas realizadas con mayor frecuencia en el mundo, representando a su vez la mayor demanda de recursos en medicina cardiovascular⁸. La CRC permite restablecer el flujo sanguíneo al musculo cardíaco, siendo esta una opción terapéutica que ha demostrado su capacidad para mejorar la angina, la calidad de vida y el pronóstico en determinado grupo de enfermos⁴²⁹⁻⁴³¹.

Durante la CRC realizada con o sin ayuda de la circulación extracorpórea (CEC), se utilizan preferiblemente injertos del mismo paciente (injertos autólogos o autoinjertos). Los injertos empleados rutinariamente son la AMI y el injerto de vena safena interna invertida (vena safena mayor). Este último injerto se usa como conducto interpuesto (*bypass*) entre

la aorta y las arterias coronarias. La principal limitación de los injertos venosos, es la disminución progresiva de su permeabilidad en el tiempo.

La AMI (injerto en forma de I, T o Y) establece un *bypass* (puente), entre la arteria subclavia y el segmento distal de las arterias coronarias afectadas por la ATS. Mayoritariamente los cirujanos preferimos emplear sistemáticamente la AMI durante la CRC. Infortunadamente, esta conveniente práctica varía ampliamente entre los diferentes grupos quirúrgicos del mundo⁸.

Los beneficios de la CRC están en relación directa con la permeabilidad de los injertos empleados en la intervención quirúrgica. A su vez, la funcionalidad a corto y largo plazo de los injertos se relaciona con la morbilidad y la mortalidad de origen cardíaco. La longevidad de los injertos y la progresión de la ATS coronaria determinan cuanto tiempo un paciente se favorecerá de la CRC.

El fracaso del injerto de vena safena pocos meses después de la CRC generalmente se atribuye a la hiperplasia de la íntima o al fallo técnico. Por el contrario, la oclusión prematura de la AMI obedece habitualmente a deficiencia en la anastomosis del injerto o a lesión del pedículo vascular durante su disección y manipulación. La ATS del injerto es responsable de la obstrucción de los injertos venosos en los 5-10 años siguientes a la CRC, lo que no sucede con la AMI⁴³².

Desde que Green y cols.⁴²⁷, difundieron el uso de la AMI en la CRC, se ha acumulado suficiente evidencia que revela que la permeabilidad de los injertos de AMI es excelente⁹⁻¹¹. Debido a que la AMI en la CRC reporta cuantiosos beneficios a largo plazo en prácticamente todos los subgrupos de pacientes^{384,433}, a que a las contraindicaciones para su utilización son excepcionales⁸ y a su reconocida resistencia al desarrollo de ATS (tanto antes como después de la CRC)⁹⁻¹¹, el injerto de AMI es considerado el *gold standar* en la CRC⁸. Existe consenso universal en que la AMI mejora la supervivencia a corto y largo plazo en la CRC^{8,434}.

En los EE.UU. de América, el uso de la AMI representa un factor categórico del índice de calidad en la CRC. Hecho este avalado por el NQF (*National Quality Forum*)⁴³⁵ y aprobado por la ACQA (*Ambulatory Care Quality Alliance*)⁴³⁶. Adicionalmente, la STS (*Society of Thoracic Surgeons*)⁴³⁷, avaló el empleo de la AMI en la CRC, como la principal medida intraoperatoria asociada a la calidad del cuidado operatorio.

Diversos estudios han mostrado que la utilización de sendas AMI (BIMA) en la CRC mejora la expectativa de vida y la recurrencia de la angina cuando se la compara con el uso de una sola AMI^{10,11,438-440}. Por consiguiente, asegurar la calidad en la CRC, es crucial para mejorar la supervivencia después de la intervención quirúrgica⁸.

16.3 Técnica quirúrgica

La derivación aortocoronaria consiste en la "conexión" entre la aorta (o alguna de sus ramas) y las regiones distales a las lesiones obstructivas (o estenosantes) de las arterias coronarias, mediante un conducto vascular (injerto) con o sin la ayuda de la CEC (cirugía clásica versus CRC sin CEC-OPCABG/off pump coronary artery bypass grafting), respectivamente.

La sutileza y el cuidado en la disección y la preparación de los injertos, además de la meticulosidad y la precisión de las anastomosis son de crítica importancia como garantes del fluio sanguíneo y por ende de la permeabilidad y la vida media del inierto^{384,441}.

La AMI en comparación con los injertos venosos empleados en la misma localización anatómica influye favorablemente en el pronóstico de los pacientes sometidos a CRC^{9,438}. Otros injertos utilizados en la CRC incluyen la arteria radial, la arteria gastroepiplóica y la arteria epigástrica inferior (Figura 61).

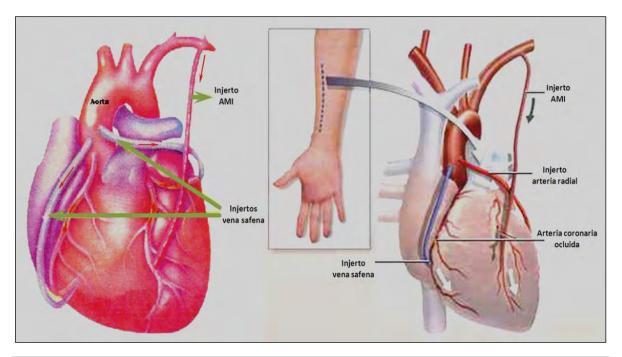


Figura 61. Cirugía de revascularización coronaria. Izquierda. La CRC (cirugía de revascularización coronaria) consiste en la anastomosis entre la aorta o alguna de sus ramas con las arterias coronarias, mediante un injerto (arterial y/o venoso). Reproducida con mínimos cambios en la forma de: *Museo Virtual René Gerónimo Favaloro. http://www.fundacionfavaloro.org/museo_legado_cientifico.html*. Derecha. Con frecuencia durante la CRC es necesario revascularizar varias arterias coronarias empleando una arteria mamaria interna (AMI) o las dos (BIMA), la arteria radial y la vena safena. Las flechas (rojas, negras y blancas) indican la dirección del flujo de los injertos. Reproducida con mínimos cambios de forma de: *http://medlineplus.gov/. A.D.A.M. Quality*.

16.4 Indicaciones generales

El tratamiento integral de los pacientes con cardiopatía isquémica incluye: 1. Medidas farmacológicas que actúan sobre la concentración del colesterol, las HDL y la agregación plaquetaria. 2. Intervenciones que mejoran el flujo coronario o que reparan las estructuras lesionadas por los episodios isquémicos. 3. Actividades preventivas, como la incentivación hacia la práctica de hábitos de vida cardiosaludables.

La CRC participa en los dos objetivos primordiales de la estrategia terapéutica de los pacientes con EC: a. Aliviar los síntomas. b. Mejorar el pronóstico y la calidad de vida. Diversos estudios avalan la efectividad de la CRC⁴²⁹⁻⁴³¹ en diferentes situaciones (clínicas y anatómicas), en relación con el tratamiento médico y la angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP)⁴³³.

Las guías de la práctica clínica en revascularización coronaria (RC), normalizan recomendaciones con diferente grado de evidencia científica acerca de la indicación de la RC (percutánea o quirúrgica), en las diferentes condiciones clínicas y/o anatómicas que presenta cada paciente con EC. No obstante, debemos tener presente que la indicación de la RC debe ser una decisión individualizada. Estas recomendaciones son alusivas a la CRC, aunque no son excluyentes para otras técnicas de RC⁴²⁹⁻⁴³¹ (Tabla 17).

Tabla 17. Indicaciones y criterios de aceptabilidad en la revascularización coronaria

\/	CRC			PCI		
Vasos coronarios afectados	NO DM FEVI normal	DM	Disfunción VI	NO DM FEVI normal	DM	Disfunción VI
EC de 2 vasos con estenosis proximal de la ADA	Α	А	Α	Α	Α	Α
EC de 3 vasos	Α	Α	Α	U	U	U
TPACI	Α	Α	Α	I	I	1
TPACI + lesión de otros vasos	Α	Α	А	I	1	1

⁽A) Apropiate (adecuada): Score 7-9. La RC se considera un método de tratamiento razonable que mejora la supervivencia y el pronóstico de los pacientes.

⁽U) *Uncertain* (incierta): Score 4-6. La RC pudiera ser un método de tratamiento razonable. No obstante, se requiere mayor investigación y/o información adicional para clasificar más adecuadamente la indicación de la RC.

⁽I) *Inappropiate* (inadecuada): Score 1-3. La RC no se considera un método de tratamiento razonable, ya que no mejora la supervivencia, ni el pronóstico de los pacientes.

RC (revascularización coronaria); CRC (cirugía de revascularización coronaria); PCI (percutaneus coronary intervention); DM (diabetes mellitus); FEVI (fracción de eyección del ventrículo izquierdo); EC (enfermedad coronaria); ADA (arteria descendente anterior); TPACI (tronco principal de la arteria coronaria izquierda); VI (ventrículo izquierdo). Modificada de: Patel MR, et al. Circulation. 2009;119;1330-1352⁴³⁰.



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la medida en que un proyecto de investigación (PI) en el área de la salud pretenda aportar beneficios a los enfermos y al medio social en el cual ellos se desarrollan, el PI debe plasmarse, ya que dichas contribuciones constituyen la esencia del mismo. El presente trabajo pretende este firme propósito.

Los diferentes planes de salud elaborados en la Comunidad Autónoma de Canarias confluyen hacia la prioridad en la actuación sobre el impacto y trascendencia de las ECV y en particular de la EC, debido a su elevada morbimortalidad, además de los costes sociales y económicos añadidos que estas enfermedades representan. La elevada prevalencia de FRECV ha condicionado a la comunidad científica a encomendar la buena práctica de hábitos de vida cardiosaludables, a más de optimizar la terapia farmacológica, como estrategias para aminorar tan ominoso horizonte.

En el último siglo se han alcanzado avances trascendentales en la biología molecular de los vasos sanguíneos. Se han logrado novedosas aportaciones acerca de los mecanismos que regulan el proceso inflamatorio y el tono vascular. El protagonismo de la respuesta inflamatoria en las lesiones ateroscleróticas, es a la luz actual mejor comprendido, lo que ha permitido buscar alternativas que modifiquen la respuesta inflamatoria en la placa de ateroma. Estos avances han tenido un impacto sustancial en la terapéutica cardiovascular en las dos últimas décadas.

Concebida como una inversión social en salud, es inaplazable fomentar y adecuar la infraestructura, el apoyo logístico y el financiamiento de aquellos estudios multidisciplinarios encaminados a la caracterización de ciertas enfermedades, como la cardiopatía isquémica, patología ésta con creciente prevalencia en el mundo entero, en

España y en determinadas poblaciones, que como la población canaria, presenta la mayor tasa de mortalidad del territorio español.

El incremento de la Hcy plasmática constituye un FR en la génesis de las ECV¹³. Ciertas variantes alélicas que codifican la expresión de la enzima MTHFR incrementan la concentración de Hcy^{179,185}. La HHcy altera el endotelio vascular, al incrementar el estrés oxidativo y disminuir la biodisponibilidad del óxido nítrico ON^{•15,152}. En el territorio vascular, la actividad PON (determinada fundamentalmente por los genes PON1 y PON2) pudiese contribuir a explicar la variabilidad en la concentración de Hcy^{20,21} y esta a su vez modificar el grado de metilación del DNA^{197,349}.

Se han descrito algunos genes cuya expresión es específica de ciertos tejidos o líneas celulares y en cuyo control intervienen, además de otras modificaciones epigenéticas, la metilación del DNA. En los vasos sanguíneos, la expresión del gen eNOS está regulada (entre otros factores) por la metilación del promotor del gen eNOS, de tal forma que su expresión queda confinada a las células endoteliales, ya que el gen eNOS no se expresa en las VSMC²⁸⁵. La disfunción del endotelio vascular representa un proceso afín a múltiples procesos fisiopatológicos (entre ellos la HHcy y la ATS) caracterizados por menor biodisponibilidad de ON^{-15,73}. Pudiesen existir discrepancias en la metilación del DNA entre los diferentes territorios vasculares (AMI *versus* aorta) que afectasen el promotor del gen eNOS o su acceso transcripcional. A su vez estas divergencias pudieran ser independientes de los genotipos que porta cada individuo.

Conscientes de la magnitud y la complejidad del proceso aterotrombótico, además de la influencia que ciertos fenómenos epigenéticos (producidos por el grado de metilación del DNA del genoma), ejercen en la génesis y evolución de la enfermedad aterosclerótica, este estudio pretende ser una aportación en la búsqueda de nuevos factores que mejoren nuestra comprensión sobre tan temido flagelo. En consecuencia, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1. Analizar la concentración de tHcy, fHcy, bHcy (Hcy-p) y el grado de metilación del DNA extraído a partir de fragmentos de AMI los cuales presumimos "sanos" (vasos no afectados o involucrados incipientemente por la enfermedad aterosclerótica) y en fragmentos de aorta ascendente (AA) que suponemos "patológicos" (punches aórticos ~ateroscleróticos) procedentes de pacientes con ATS coronaria documentada angiográficamente e intervenidos quirúrgicamente mediante CRC.
- 2. Evaluar la contribución de los polimorfismos C677T del gen MTHFR, Gln192Arg y Met55Leu del gen PON1 y Cys311S del gen PON2 a la variabilidad en la concentración de tHcy, Hcy-p y fHcy. Investigar adicionalmente si estos hallazgos se corresponden con hipometilación del DNA.
- 3. Establecer un modelo de regresión lineal con la finalidad de analizar la contribución de los diferentes genotipos a la variación en los niveles de tHcy, Hcy-p y fHcy, así como al grado de metilación del DNA.
- 4. Valorar las diferencias en el grado de metilación del DNA en ambos territorios arteriales (AMI *versus* aorta).
- 5. Analizar la expresión de los genes eNOs, iNOs y DDAH2 en los homogeneizados vasculares procedentes de los fragmentos de AMI y de los *punches* aórticos.
- 6. Evaluar la participación de los fenómenos de hipometilación en territorio arterial "sano" (AMI) y patológico (aterosclerótico ~punches aórticos), utilizando como testigo la diferencia en la expresión del gen eNOS, determinada en función del grado de metilación del promotor del gen DDAH2.

Con el presente estudio, pretendemos favorecer el avance en el conocimiento de los mecanismos implicados en la formación de la placa de ateroma en la práctica clínica. En esta línea de actuación esperamos contribuir a esclarecer la causalidad asociada a un FR conocido, la Hcy. Procuramos además, proporcionar la máxima relevancia pública a los resultados obtenidos.



METODOLOGÍA

1. Tipo de estudio

Estudio observacional descriptivo de individuos (serie de casos) y observacional analítico de casos/controles.

2. Técnica operatoria y toma de muestras

2.1 Técnica operatoria

Como criterios para la indicación de la CRC tuvimos en consideración las recomendaciones de las guías actualizadas de la práctica clínica de la SEC⁴²⁸ y del ACC/AHA (*American College of Cardiology/American Heart Association*)⁴²⁹, publicadas hasta la fecha en que se realizó el estudio.

En todos los pacientes en los que se indicó la CRC empleamos injertos autólogos. Consideramos como primera elección la AMI izquierda en la revascularización coronaria de la arteria descendente anterior (ADA): Recomendación Clase I, Nivel de Evidencia B del ACC/AHA.

En la RC de los demás territorios del lecho arterial coronario utilizamos la AMI, la arteria radial y/o la vena safena invertida (interna o externa), según la elección del cirujano y/o el perfil de cada paciente.

Realizamos CRC sin CEC (Tabla 18), fundamentalmente en aquellos pacientes en quienes procuramos conseguir mayor beneficio con esta técnica que con la CRC clásica (CRC con CEC).

Tabla 18. Indicaciones de la cirugía de revascularización coronaria sin circulación extracorpórea

Patología vascular periférica y/o de troncos supra-aórticos

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

Accidente cerebrovascular previo

Antecedentes de cirugía cardiaca previa

Aorta ascendente calcificada (aorta en porcelana)

Insuficiencia renal crónica

Enfermedades oncológicas de pronóstico aceptable

Angina posinfarto reciente con inestabilidad hemodinámica

Enfermedad coronaria severa de tres vasos con mala función ventricular

Por lo tanto, elegimos la CRC sin CEC en los enfermos que potencialmente pudiesen estar más afectados por la CEC. En la tabla 18 reflejamos las indicaciones más frecuentes de la CRC sin CEC en nuestros pacientes.

2.2 Técnica quirúrgica

Bajo anestesia general, previa asepsia y monitorización del paciente, se procedió a realizar esternotomía media, al mismo tiempo que se inició la disección y preparación de los injertos de vena safena (cuando se consideró su indicación). Con antelación a la apertura del pericardio y a la administración de heparina sódica (a través de una vía venosa central), se disecó y movilizó la AMI, impregnándola con una solución que contenía sulfato de magnesio y papaverina (Figura 62).

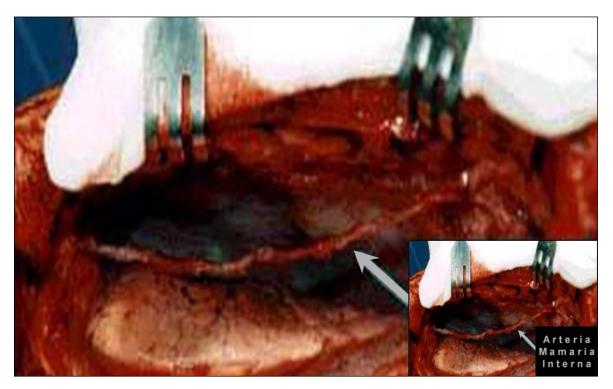


Figura 62. Arteria mamaria interna izquierda in situ. Imagen anatómica de la AMI (arteria mamaria interna) izquierda visualizada desde la óptica del cirujano. Adaptada de: *Levinson MM. The Internal Mammary Artery. The Heart Surgery Forum: a cardiothoracic multimedia journal. http://www.hsforum.com.*

Posteriormente se procedió a seccionar el injerto de AMI en su porción distal, justo antes de realizar la anastomosis en el lecho nativo de la arteria coronaria afectada, el cual en la mayoría de los enfermos correspondió a la ADA. Durante la preparación de la AMI, rutinariamente se descarta un pequeño fragmento distal, entre otros motivos, por ser de menor calibre. Estos diminutos fragmentos de AMI fueron empleados para realizar el presente estudio (Figura 63).



Figura 63. Arteria mamaria interna "esqueletizada". Disección, movilización y sección distal de la arteria mamaria interna (AMI) izquierda. Proceso de preparación de la AMI previo a su anastomosis en el lecho arterial coronario. Perspectiva desde la situación del cirujano. Adaptada de: Levinson MM. The Internal Mammary Artery. The Heart Surgery Forum: a cardiothoracic multimedia journal. http://www.hsforum.com.

Una vez efectuadas las anastomosis distales en el lecho coronario, se procedió a elaborar las anastomosis proximales de los injertos venosos cuando se consideró pertinente. En tal caso, se pinzó la pared lateral de la AA, y con un instrumento para "sacabocados" (punch aórtico) de 4 milímetros de diámetro, se efectuaron orificios en número variable, dependiendo de las anastomosis proximales requeridas. Estos minúsculos fragmentos de AA extraídos durante esta maniobra, fueron objeto del presente trabajo (Figura 64).

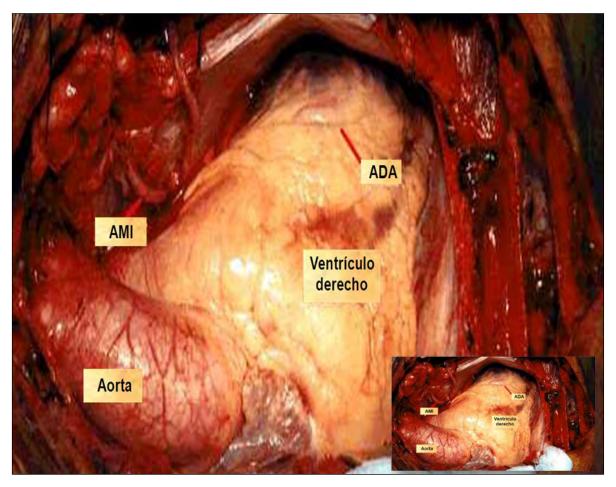


Figura 64. Anatomía del corazón, aorta ascendente y arteria mamaria interna. Imagen del corazón, los grandes vasos y la arteria mamaria interna (AMI) izquierda movilizada y seccionada distalmente (ubicada en el receso pleural izquierdo), previo a su anastomosis en el lecho nativo de la arteria descendente anterior (ADA). Panorámica obtenida desde la perspectiva del cirujano durante la cirugía de revascularización coronaria (CRC) sin circulación extracorpórea (CEC) (CRC sin CEC/OPCABG/off pump coronary artery bypass grafting). Adaptada de: Levinson MM. The Internal Mammary Artery. The Heart Surgery Forum: a cardiothoracic multimedia journal. http://www.hsforum.com.

Se notificó a los enfermos y a sus familiares (de forma amplia y suficiente) acerca de la CRC con la debida antelación a la intervención quirúrgica. Se obtuvo el consentimiento informado (preestablecido rutinariamente en la institución para llevar a cabo el procedimiento anestésico y la CRC) referente a las instrucciones generales, los riesgos y los beneficios de la cirugía, requisitos sine qua non, para el ingreso del paciente en el quirófano. Adicionalmente se diligenció el consentimiento informado para la participación discrecional en el estudio de investigación, en el que se incluyó la pesquisa alusiva a las determinaciones genéticas. Ambos documentos fueron

tramitados por el personal facultativo idóneo y los investigadores respectivamente, de conformidad con la legislación española y comunitaria vigente⁴⁴²⁻⁴⁴⁴.

Elaboramos el formulario para el registro de la base de datos de cada paciente con ayuda del programa *Acces* de *Microsoft Office* (versión 2007). Recogimos una serie de variables: 1. Variables cualitativas (género, tabaquismo, DM, DLP e HTA); EC en familiares en primer grado de consanguinidad; clase funcional de la NYHA (*New York Heart Association*); clase de angina de la CCS (*Canadian Cardiovascular Society*); fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI); descripción anatómica y número de arterias coronarias enfermas. 2. Variables cuantitativas (edad, índice de masa corporal (IMC), perfil lipídico, tHcy, proteína C reactiva, fibrinógeno, urea, creatinina, ácido fólico y vitamina B₁₂).

3. Tamaño muestral

Las muestras fueron obtenidas de pacientes intervenidos consecutivamente de CRC, entre el 4 de abril de 2005 y el 2 de febrero de 2006. De este grupo de pacientes, ingresaron al protocolo del estudio exclusivamente aquellos individuos en los cuales durante el procedimiento quirúrgico se logró obtener al menos un trozo de AMI. Si durante la movilización de la AMI se consideró que esta era demasiado pequeña, que su flujo era escaso o si la AMI se lesionó durante su preparación, la AMI no se utilizó como injerto. No obstante, tanto el paciente como la AMI, hicieron parte del trabajo de investigación. En muy pocos casos de ambos géneros, el flujo de la AMI fue inadecuado para satisfacer la demanda de flujo de la arteria coronaria nativa, objeto del *bypass*. Todos los pacientes fueron operados en el Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Universitario de Gran Canaria "Dr. Negrín", siguiendo técnicas y procedimientos habituales de CRC. Los análisis bioquímicos generales se realizaron en el laboratorio clínico de la institución. Las muestras de AMI y AA fueron referidas a la unidad de investigación del mismo hospital, para su correspondiente análisis (Figura 65).



Figura 65. Hospital Universitario de Gran Canaria "Dr. Negrín". Las Palmas de Gran Canaria, España. Servicio Canario de Salud. *http://www.gobiernodecanarias.org.* Imágenes satélite de ESRI (World imagery).

Compilamos ciento noventa y dos (192) pacientes, de los que logramos disponer de un conjunto mínimo de datos. La información clínica y genética quedó subdividida de la siguiente forma: cuarenta y cinco (45) pacientes de los que conseguimos disponer de información clínica exhaustiva, incluyendo: historia familiar, IMC, FEVI, DM, DLP, HTA, concentración de colesterol total (CT), triglicéridos, lipoproteína a (Lip-a), LDL, HDL, apo-A1, apoB, tHcy, creatinina, urea, ácido fólico y vitamina B₁₂. Ciento diez (110) pacientes de los que logramos obtener información sobre el contenido de proteínas S-homocisteiniladas y/o contenido protéico y/o ratio y/o genotipos PON1 (Gln192Arg y/o Met55Leu) y/o PON2 (Cys311Ser) y/o MTHFR C677T. Cuarenta (40) pacientes en los que además de la AMI, obtuvimos al menos un fragmento aórtico, logramos extraer RNA y en consecuencia,

pudimos evaluar comparativamente la expresión de los genes eNOS y/o iNOS y/o DDAH2 y/o el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 (Figura 66).

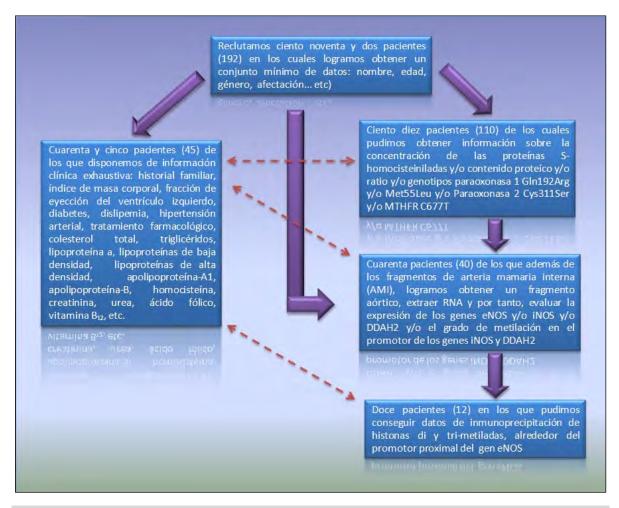


Figura 66. Descripción del tamaño muestral: diagrama de flujo.

4. Extracción del DNA

El DNA se extrajo de los homogeneizados de la AMI (Figura 67), por medio del procedimiento estándar de "salting-out", con pequeñas modificaciones (Salting-out procedure). Este método simplifica el procedimiento de desproteinización mediante "salting out" de las proteínas celulares, por deshidratación y precipitación con una solución saturada de cloruro de sodio (NaCI). Es por lo tanto, una técnica de separación protéica basada en el principio de que las proteínas son menos solubles a elevadas concentraciones de NaCI. A bajas concentraciones de NaCI, la solubilidad de las proteínas

Relevancia de polimorfismos génicos y la S-homocisteína en la epigénesis en arteria mamaria interna y aorta

incrementa ligeramente (*salting-in*), pero a altas concentraciones la solubilidad de las proteínas disminuye bruscamente (*salting-out*)⁴⁴⁵. Tras la cuantificación espectrofotométrica, se prepararon diluciones a concentraciones conocidas (Figura 67).

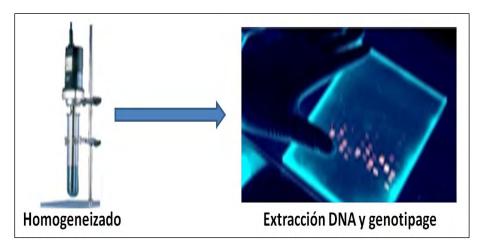


Figura 67. Homogeneizado vascular de arteria mamaria interna, extracción del DNA y genotipage.

5. Determinación de la variante C677T [rs1801133, g.14783C>T, pAla222Val] del gen MTHFR

La variante C677T se determinó mediante amplificación por PCR convencional (polymerase chain reaction) y digestión enzimática RFLP (restriction fragment length polymorphysm), utilizando la enzima de restricción Hinfl (cepa de E. coli que porta el gen de Haemophilus influenzae). La RFLP (PCR-RFLP), es una técnica que radica en el corte del DNA con endonucleasas de restricción (endonucleasas que reconocen una secuencia específica) de los productos amplificados por PCR. Los fragmentos resultantes se separan según su longitud mediante electroforesis en gel de agarosa, siendo transferidos posteriormente a una membrana en la cual se efectúa la hibridación de la sonda, a través del procedimiento de Southern blot o hibridación Southern (método de biología molecular ideado por el biólogo Inglés Edwin Southern, que permite detectar la presencia de una secuencia de DNA en una mezcla compleja de este ácido nucleico).

Seguimos el protocolo de Frosst y cols. 179, con algunas variaciones. Para la amplificación por PCR empleamos los primers (cebadores/iniciadores) HM1 TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' (sentido) HM₂ (5'-٧ AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3') (antisentido). Se amplificó un fragmento de 198 bp (pares de bases), sometido posteriormente a digestión enzimática con 10U de Hinfl (New England Biolabs, Inc. UK). El alelo 677T contiene un sitio de restricción Hinfl, resultando como consecuencia la aparición de dos fragmentos de 175 bp y 23 bp. Por el contrario el alelo C en la posición 677 (677C) carece de sitio de restricción Hinfl. Los productos derivados de la PCR y de la digestión enzimática, se analizaron en un gel de agarosa TBE (Tris-Borato-EDTA) al 3%. Establecimos la categoría de las muestras como homocigótica para la variante termolábil (677T), heterocigótica (C677T) o la tipo silvestre (677CC)⁴⁴⁶ (Figura 68).



Figura 68. Reacción en cadena de la polimerasa. Izquierda. Equipo de PCR convencional Perkin 9600. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es conseguir un gran número de copias (amplificación) de un fragmento de DNA, partiendo de una copia única del fragmento original o molde. Tras su amplificación, resulta más cómodo hacer investigación sobre el DNA amplificado. El proceso de PCR está automatizado mediante un termociclador, el cual permite calentar y enfriar los tubos de reacción para adecuar la temperatura necesaria para cada etapa. Los termocicladores modernos hacen uso del efecto *Peltier*, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción invirtiendo la corriente eléctrica. Derecha. Equipo de PCR en tiempo real CFX de Biorad. La PCR en tiempo real, también conocida como PCR cuantitativa (qPCR), es una variante de la PCR, utilizada para ampliar y cuantificar simultáneamente de forma absoluta el producto de la amplificación. Su característica primordial es que permite cuantificar el DNA o el RNA presente en la muestra original, además de identificar muestras de DNA específicas, a partir de su temperatura de fusión.

6. Determinación de los genotipos Gln192Arg [rs662, g21439A>G, pGln192Arg] y Met55Leu [rs85 del gen PON1]

Determinamos los genotipos Gln192Arg y Met55Leu del gen PON1 mediante PCR-RFLP, según las técnicas descritas por Humbert y cols. 228 y Shanguera y cols. 260. Para la identificación del polimorfismo Gln192Arg, se emplearon los primers PON1A (5'TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3') y PON1B (5'CACGCTAAACCCAAATACATCTC-3'). En la tipificación del polimorfismo Met55Leu, se utilizaron los primers PON1 55f (5'-GAGTGATGTATAGCCCCAG-3') PON1 GAA У 55r (5'-TTTAATCCAGAGCTAATGAAAGCC-3'). La amplificación de la variante PON1 192, genera un producto de 99 bp que fue digerido con la enzima de restricción Alwl (cepa de E. coli que porta el gen de Acinetobacter Iwoffii) de (New England Biolabs, Inc. UK), a 37°C durante toda la noche, de acuerdo a la siguiente mezcla: 2 µl 10× buffer, 1 µl Alwl, 7 µl aqua destilada estéril y 10 µl del producto de la PCR. Los productos de la digestión, se revolvieron en geles de agarosa en TBE al 3.5%, se tiñeron tras la correspondiente electroforesis con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta, generándose una banda de 99 bp en los homocigóticos Gln/Gln y de 66 bp y 33 bp en los homocigóticos Arg/Arg. El producto de amplificación Met55Leu de 170 bp, se digirió con Hsp192II (Haemophilus species 92) de (Promega, Madison, USA), en presencia de seroalbúmina bovina (0.1 µg/µL a 37°C durante toda la noche). El alelo L (Leu) no contiene sitio Hsp192II, por el contrario el alelo M (Met), sí que posee diana de restricción, por lo que se generan dos bandas de 126 bp y 44 bp, respectivamente.

7. Determinación del polimorfismo Ser311Cys del gen PON2

Se utilizó el *primer* sentido PON2 F9 (5'-ACATGCATGTACGGTGGTCTTATA-3') y el *primer* antisentido PON2 R9 (5'-AGCAATTCATAGATTAATTGTTA-3'), para amplificar la

región del *target*, como fue descrito para la determinación del polimorfismo Cys311Ser del gen PON2^{228,260}. La amplificación por PCR del amplicón del gen PON2, genera un fragmento de DNA de 262 bp. La digestión con la enzima de restricción Ddel (Desulfovibrio desulfuricans, cepa Norway), genera en caso del alelo Cys, dos bandas de 142 bp y 120 bp respectivamente, mientras que en el caso del alelo Ser, genera tres bandas de 120, 75 y 67 bp, respectivamente.

8. Determinación del grado de metilación en el promotor del gen DDAH2

Evaluamos el grado de metilación del promotor del gen DDAH2, mediante un protocolo de PCR anidada específica para metilación (nMSP/nested Methylation Specific PCR analysis)²⁵. La nMSP, es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos *primers* en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad de la detección. Primero se realiza una reacción con los iniciadores externos para amplificar una región del DNA más extensa, que contiene el segmento diana. Posteriormente con este producto de amplificación, se efectúa una segunda PCR con los iniciadores internos, para amplificar la región específica. La PCR anidada tiene la ventaja de su alta sensibilidad y especificidad. Si bien, no permite cuantificar la muestra.

El DNA genómico se extrajo como se ha descrito con antelación. La preparación final alcanzó un *ratio* de A260: a280 entre 1.6 y 1.8. Se trataron 2 µg de DNA de cada muestra con bisulfito de sodio (*Sigma*, USA) a 50°C durante 16 horas. Empleamos la nMSP para la detección del patrón de metilación en la región del promotor de la isla CpG del gen DDAH2 (*GenBank* AF129756). Este método, se basa en el hecho de que el tratamiento del DNA desnaturalizado con bisulfito de sodio, convierte todos los residuos de citosina a uracilo, los cuales son luego amplificados como timinas en las reacciones de PCR. Por el contrario, la 5 metilcitosina, es resistente a la desaminación del bisulfito, bajo las condiciones de la reacción y es amplificada como citosina. Como hemos mencionado, la

nMSP consta de dos pasos en la amplificación de la PCR. El primer paso de la nMSP utiliza un par de iniciadores externos que no contiene ningún grupo CpG. En el segundo paso, la PCR se llevó hacia afuera con los iniciadores de PCR convencionales.

Las secuencias de los cebadores y de las condiciones de las reacciones de las nMSP, se muestran en la tabla 19²⁵.

Tabla 19. Secuencia de primers y condiciones de la reacción de nMSP

Primer set	Secuencia de <i>primers</i> (5'→3')	Tamaño productos	Temperatura de anillamiento
DDAH2-n	TAGTGATTTTGAGTTTAGGGTAGA	581 bp	65°C
	ACTCCCCATACTCTCTATCTAAT		
DDAH2-M	TTTGTAGTTTCGTCGTTAGGGTC	244 bp	65°C
	TAACGAAAATCCTTATATAAACGAA		
DDAH2-U	TTGTAGTTTTGTTGTTAGGGTTGG	243 bp	65°C
	TAACAAAAATCCTTATATAAACAAA		

nMSP (nested Methylation Specific PCR analysis); DDAH2 (dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2). Modificada de: Zhang JG, et al. Chin Med J (Engl) 2007;120(23):2132-2137²⁵.

Empleamos el protocolo PCR *touchdown* (TD-PCR) para la amplificación. La TD-PCR, es una variante de la PCR que se emplea cuando se desconoce la secuencia exacta de los extremos de la secuencia a amplificar. En consecuencia, se asume que puede existir alguna base desapareada en el alineamiento cebador-secuencia. Su objetivo es reducir el fondo no específico, disminuyendo gradualmente la temperatura de hibridación a lo largo del progreso de la PCR.

Posteriormente a la desnaturalización inicial, las muestras se sometieron a 20 ciclos de un programa TD (*touchdown*), con la secuencia inicial: 94°C durante 45 segundos, anillamiento durante 45 segundos y posterior extensión a 72°C durante 45 segundos, seguido por disminución de 1°C de la temperatura de anillado en los ciclos consecutivos. Después de completar el programa TD, amplificamos 20 ciclos más con la secuencia: 94°C durante 45 segundos, 45°C durante 45 segundos y 72° durante 45 segundos. Ya finalizando, añadimos una extensión adicional a 72°C durante 5 minutos.

Se realizó electroforesis sobre un gel de agarosa y visualización por tinción con bromuro de etidio de los productos de la segunda reacción de la PCR.

9. Extracción del RNA

El RNA total se extrajo de los fragmentos de la AMI y de los *punches* aórticos, mediante el método del isotiocianato de guanidina⁴⁴⁷. El material utilizado se esterilizó dos veces en autoclave (*P-selecta Auster-M*). La solución de acetato sódico se preparó añadiendo 16.42 g de acetato sódico anhidro, a 40 ml de H₂O y 35 ml de ácido acético glacial. Se ajustó la solución a pH 4 con ácido acético glacial y el volumen final a 100 ml con H₂O. La solución obtenida es 2M con respecto a los iones de sodio. El agua DEPC (dietilpirocarbonato), se preparó tomando 100 ml de H₂O destilada estéril tratada previamente con 0,2 ml de dietilpirocarbonato y se agitó vigorosamente hasta su solubilización.

Posteriormente el aqua DEPC se esterilizó en autoclave en dos ocasiones, para inactivar el DEPC restante. El homogeneizado vascular se congeló con nitrógeno líquido en un pequeño mortero y se pulverizó en presencia de solución ITG. Se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos, resuspendiendo el pellet (material sedimentado) en 1 ml de una solución desnaturalizante que contenía isotiocianato de guanidina 4M y con ayuda de una pipeta se disgregó el tejido, repitiéndose este proceso entre siete y diez veces. La solución desnaturalizante ITG contiene: isotiocianato de quanidina 4M, 25 mM de citrato sódico (pH 7), 0.1 M 2-mercaptoetanol, 0.5% N-laurilsarcosina (sarcosilo). Se preparó una solución stock disolviendo 250 g de tiocianato de quanidina en una solución de: 293 ml de H₂O DEPC, 17.6 ml de citrato sódico 0.75M (pH 7) y 26.4 ml de 10% sarcosilo a 60-65°C, seguido de agitación. Inmediatamente antes de su utilización, se añadieron 0,35 ml de 2mercaptoetanol por cada 50 ml de solución stock. El homogeneizado se transfirió a un tubo Falcon de 5 ml y se le añadió 0,1 ml de acetato sódico 2M (pH 4), mezclando vigorosamente por inversión. Al resultado se le añadió 1 ml de fenol saturado en agua DEPC y mezclado, adicionando 0,2 ml de una solución 49:1 de cloroformo/alcohol isoamílico. La solución de fenol se preparó disolviendo 100 g de cristales de fenol en H₂O

a 60-65°C y aspirando la fase acuosa superior. La solución resultante se mezcló e incubó durante 15 minutos a 4°C (Figura 69).



Figura 69. Autoclave P-selecta Auster-M, equipo para producir agua destilada y centrífuga.

Al finalizar el período de incubación, la mezcla se centrifugó a 9000 rpm durante 20 minutos a temperatura de 4°C, transfiriendo la fase acuosa superior a un tubo Falcon limpio (la fase acuosa superior contiene RNA, quedando el DNA y las proteínas en la interfase o en la zona inferior). El volumen de fase acuosa a recoger, es aproximadamente igual al de la solución desnaturalizante añadida. Se precipitó el RNA añadiendo al tubo un volumen igual de isopropanol al 100% e incubando las muestras a -20°C durante 30 minutos. Se centrifugó el tubo a 9.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante. Posteriormente se disolvió el *pellet* con 0,3 ml de solución desnaturalizante y se trasladó a un tubo de microcentrífuga de 2 ml. Se precipitó el RNA con 0,3 ml de isopropanol al 100% e incubando a -20°C durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó después de una nueva centrifugación a 9.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. A continuación se resuspendió el *pellet* de RNA en 1 ml de etanol al 75% durante 10 minutos a temperatura ambiente, con la finalidad de eliminar cualquier resto de guanidina que

contaminara el *pellet*. Posteriormente se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 9.000 rpm y se secó el RNA en una cámara de vacío Univapo 100-H (*Uniequip GMBH, Fraunhoferstr, Germany*) durante 5 minutos, evitando que se produjera un secado completo. Luego se disolvió el RNA en 200 µl de agua DEPC, pipeteando la solución varias veces con precaución y delicadeza. Se incubó el RNA durante 15 minutos a 55°C y se cuantificó el RNA, leyendo alícuotas del mismo disueltas en agua alcalina en el espectrofotómetro, a una absorvancia de 260 y 280 nm.

10. Transcripción Inversa del RNA

La transcripción inversa del RNA se llevó a cabo en un volumen final de 20 μl, utilizando el kit "iscript" de Biorad, siguiendo detalladamente las instrucciones que acompañan al reactivo. Se preparó una solución madre que contenía 4 μl de Buffer 5x, 2 μl de y transcriptasa inversa en agua DEPC, alcanzando un volumen total de 10 μl, al que se le añadió 10 μl del RNA almacenado, con un total de 2 μg de RNA. La mezcla se llevó a una temperatura de 70°C durante 10 minutos. Se pasó posteriormente por agua y hielo, hasta conseguir una temperatura de 25°C durante 15 minutos y posteriormente a 42°C durante 60 minutos.

Este proceso se realizó en un termociclador *Perkin Elmer* 9600 (*Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Illinois, USA*). El DNA complementario (cDNA) resultante se conservó a 4°C.

11. Expresión de los genes eNOs, iNOs y DDAH2 en los homogeneizados vasculares

Utilizando el programa *Primer-*3 (http://frodo.wi.mit.edu/), diseñamos los siguientes *primers* para la cuantificación relativa de la expresión de los genes eNOS (NOS3) e iNOS

(NOS2): HenosRight: 5'TGATGCATTGGATCTTTGGA3' y HenosLeft: 5'CCATGTTACTGTGCGTCCAC3' y HiNOSRight: 5'TCCCGTCAGTTGGTAGGTTC3' y HiNOSLeft: 5'ACAAGCCTACCCCTCCAGAT3'. Los amplicones resultantes tenían tamaños de 226 bp y 158 bp, respectivamente.

Resultó de interés la evaluación de la expresión génica del gen DDAH2, tanto para la evaluación de las diferencias entre ambos territorios (AMI *versus punches* aórticos), como para determinar los índices de correlación con el grado de metilación del promotor del gen. Para su evaluación cuantitativa, utilizamos los siguientes *primers*: RTDDAH1-S: GGAGGTAAACTGAGGCAACG y RTDDAH1A: ACAGTGGAGACGGCGAAG. En todos los casos se realizó una reacción de normalización, para lo que se amplificó un fragmento del gen GAPDH con los *primers*: *Human* GAPDH R: 5'GGCCTCCAAGGAGTAAGACC3'y *Human* GAPDH L: 5'AGGGGTCTACATGGCAACTG3 (GAPDH entre 1031-1177 bp; BC020308).

12. Protocolo HPLC

En aquellos casos en los que se determinó la tHcy, ésta se evaluó mediante inmunofluorescencia polarizada (*Abbot division Diagnostic*). La tHcy se definió como la concentración plasmática total de Hcy después de la escisión reductiva cuantitativa de todos los enlaces disulfuro. De igual forma, en esta serie de pacientes se evaluaron los niveles plasmáticos de vitamina B₁₂ y ácido fólico, mediante ensayo enzimático de micropartículas y la técnica de captura iónica, respectivamente. La cuantificación de la concentración de tHcy se evaluó también mediante cromatografía líquida de alta eficacia HPLC (*high performance liquid chromatography*). Hubo una excelente correlación entre los diferentes métodos empleados.

Los niveles de proteínas homocisteiniladas en los fragmentos de AMI se midieron como describen Perna y cols.⁴⁴⁸. El método de HPLC fue lineal hasta 100 mmol/L y demostró ser sensible, con un límite de detección de 5 mol/L de D/L-homocisteína.

Para nuestro estudio se empleó un cromatógrafo *VARIAN* PS230 (serie 1644) y cromatografía de fase reversa (RP-HPLC). La cromatografía de fase reversa, se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria apolar. El derivatizador utilizado fue el 7-fluorobenzeno-2-0xa-1,3-diazole-4-sulfonato (SBD-F). Se preparó disolviendo 10 mg en 10 ml de agua bidestilada estéril y se rotuló como SDB-F (Figura 70).



Figura 70. Cromatógrafo VARIAN PS230. La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada para detectar y separar los diferentes componentes de una mezcla, basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las substancias analizadas y la columna cromatográfica.

Para determinar la Hcy unida a proteínas mediante puentes disulfuro, utilizamos como agente reductor el ditiotreitol (DTT), a una concentración de 1mmol/l. La muestra (50µl) se redujo a 50 °C durante 60 minutos. Para la determinación de Hcy unida a proteínas mediante enlaces amida, la muestra en seco se sometió a hidrólisis ácida durante toda la noche a 110°C en un tubo de vacío. La muestra reducida o sometida a hidrólisis ácida continuó un procesamiento similar a partir de este punto.

Se utilizó ácido tricloroacético (TCA) para la precipitación de proteínas. El TCA se preparó disuelto en agua (1 gr en 10 ml). Para la reacción se preparó también hidróxido de sodio (NaOH) 1.55 mol/L, disolviendo 6,2 gr en 100 ml y se rotuló como NaOH 1.55M. Se necesitó también preparar una solución disolviendo 7.7 gr de ácido bórico en 500 ml de aqua que se llevó a pH 9.5. Una vez alcanzado el pH, se añadieron 11.68 gr de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y se rotuló como Buffer Borato. La elución cromatográfica se realizó isocráticamente en Buffer fosfato de potasio dihidrógeno anhídrido (KH₂PO₄). Para ello preparamos una dilución de 13.61 gramos en 1 litro de agua equivale a 0.1 M, a la que finalmente se le añadieron 40 ml de acetonitrilo. El Buffer de elución se filtró y se degasificó mediante procedimientos rutinarios. Los estándares se prepararon a diferentes concentraciones, utilizando la mezcla racémica DL-homocisteína (DL-Hcy) de Sigma. disuelta en aqua. Así mismo, para evaluar diferencias en el procesado de la muestra se utilizó un "estándar interno", el dihidroclorato de cysteamina (β-mercaptoetilamina) de Sigma. Empleamos una concentración final de 10 µlmol/l, que se obtiene añadiendo 30 µl de una solución de 50 µlmol/l de cisteamina más 120 µl de la muestra (5.68 gramos por litro o 0.568 gramos en 100 ml). Se mezclaron 200 µl de plasma con 100 µl de IS dihidroclorato de cisteanina (30 µmol/l) y 200 µl de 1µmol/L de DTT. Esta mezcla se incubó a 50 °C durante 60 minutos. La desproteinización se realizó con acido perclórico en 1 mmol/I EDTA y se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se filtró a través de un filtro Millipore y luego se mezclaron 100 µl del sobrenadante con 200 µl de 0.2 mmol/l de *Buffer* de Borato con 4 μ mol/l de EDTA a ph 9.5 y con 20 μ l de NaOH y 50 μ l de SBD-F. Se incubó a 60° C durante 1 hora y se analizan 20 μ l. Como se ha señalado, utilizamos una columna de fase reversa *Sperisorb* ODS2 4.6NM 5 μ M y como fase móvil 0.1 mol/l de KH₂PO₄ a pH 2 conteniendo 40 ml/l de acetonitrilo a una velocidad de 0.8 ml/min (Figura 71).

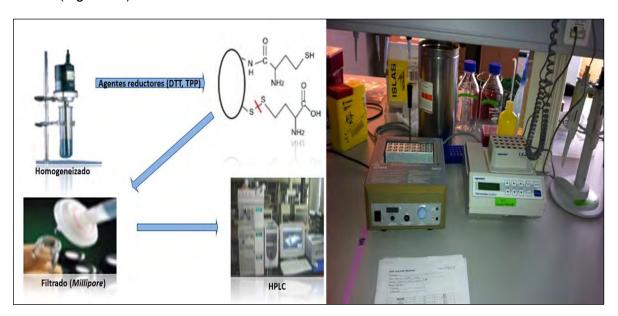


Figura 71. Valoración de las proteínas homocisteiniladas. Determinación de Hcy unida a proteínas (Hcy-p), en los homogeneizados de arteria mamaria interna (AMI). Para determinar la Hcy-p mediante puentes disulfuro (S-Hcy-p), utilizamos como agente reductor el ditiotreitol (DTT). Para estimar la Hcy-p mediante enlaces amida (N-Hcy-p), la muestra se sometió a hidrólisis ácida en placas calefactoras (imagen derecha). Empleamos ácido tricloroacético (TCA) para la precipitación de las proteínas y acido perclórico para la desproteinización. El sobrenadante se filtró a través de un filtro *Millipore*. Se empleó un cromatógrafo *VARIAN* PS230 y cromatografía de fase reversa (RP-HPLC). HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia); TPP (trifenilfosfina); SH (grupo sulfidrilo o tiol/thiol); NH₂ (grupo amino); O (oxígeno); C (carbono); H (hidrógeno).

13. Determinación protéica por el Método de Lowry

El método de Lowry, es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra, se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad del color de la dilución resultante, proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

Para calcular la concentración de proteínas del homogenizado arterial (AMI y aorta) se empleó el método de Lowry⁴⁴⁹, utilizando 6 estándares de concentración creciente preparados con 50 µl del reactivo *Bio-Rad Protein Assay*, para encontrar la recta de

concentraciones en la cual interpolar nuestras muestras. Para ello se empleó el lector ELISA EL_x 800 a 590 nm (*Bio-Tek Instruments, Inc, Vermont, EE.UU.*), usando una computadora *Siemens* que recopilaba y analizaba los datos con el *software Kc-Junior* (*Bio-Tek Instruments, Inc, Vermont, EE.UU.*). En la figura 72 se muestra el lector de absorbancia. Como concentraciones de trabajo se prepararon 400 µg de proteínas totales en 100 µl de volumen, completando con PBS (*Buffer* fosfato salino).



Figura 72. Lector de absorbancia ELISA EL_x800. El lector de placas (microplacas), es un instrumento que permite detectar eventos biológicos, químicos o físicos en muestras contenidas en placas de microtitulación. Son ampliamente utilizados en investigación. Los modos más habituales de detección para los ensayos de microplacas son: absorbancia, intensidad de fluorescencia, luminiscencia, fluorescencia resuelta en el tiempo y polarización de fluorescencia. La detección o medida de la absorbancia se utiliza para ensayos, como los análisis ELISA, para la cuantificación de proteínas y ácidos nucléicos o para ensayos de actividad enzimática (viabilidad celular). Una fuente de luz ilumina la muestra con una longitud de onda específica (seleccionada mediante un filtro óptico, o un monocromador). Un detector de luz situado en el otro lado del pozo, mide qué porcentaje de la luz inicial (100%), se transmite a través de la muestra. La cantidad de luz transmitida estará relacionada con la concentración de la molécula de interés.

14. Análisis estadístico

Efectuamos el análisis estadístico de los resultados del estudio con el programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) para Windows, versión 15.0 (SPSS *Inc. Illinois USA*). Los valores de los resultados obtenidos se expresaron mediante la media aritmética (medida de tendencia central) y la desviación típica de la media (medida de dispersión). Analizamos la distribución de las muestras mediante las pruebas de

normalidad de Shapiro Wilks y el estadístico Z de Kolmogorov-Smirnov (con la corrección de Liliefors). Establecimos el nivel de significación considerando un valor de p < 0.05. Evaluamos las diferencias estadísticas entre las medias muestrales en función del genotipo, mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Cuando el tamaño muestral era pequeño (< 10), utilizamos la prueba de Kruskal-Wallis (*test* no paramétrico), seguido de las comparaciones pareadas de la U de Mann-Whitney.

Describimos las variables cuantitativas como los valores medios ± la desviación típica, a menos que las especificáramos como el valor medio ± el error típico de la media. Representamos las variables cualitativas como frecuencias absolutas y relativas y/o porcentajes. Realizamos la comparación de las medias a través de la T de *Student* para las muestras independientes o las pruebas alternativas no paramétricas (la prueba de Wilcoxon y la *U* de Mann-Whitney, cuando fue necesario). Ambas pruebas constituyen alternativas a la T de *Student*, bajo el supuesto de normalidad.

Las comparaciones entre pares para grupos relacionados se efectuaron mediante la prueba de Wilcoxon. Empleamos la U de Mann-Whitney para las comparaciones de pares de grupos no relacionados. Estas pruebas no exigen ningún tipo de distribución a las variables y por ello no utilizan los valores obtenidos, ni ningún parámetro calculado con ellos, sino los rangos que se pueden establecer con estos valores. El test de Wilcoxon/Mann-Whitney, contrasta la hipótesis nula de que una distribución continua es simétrica en torno a una mediana hipotética (M0). Si la hipótesis nula es cierta, entonces estas diferencias han sido tomadas de una distribución que es simétrica con respecto a cero.

Evaluamos las comparaciones entre más de dos grupos mediante el test de *Kruskal-Wallis*. Determinamos la correlación entre las variables continuas mediante la Rho (ρ) de *Spearman*. Las diferencias entre grupos en función de las variables cualitativas, se

Relevancia de polimorfismos génicos y la S-homocisteína en la epigénesis en arteria mamaria interna y aorta muestran en tablas de contingencia. Realizamos la prueba de Chi-cuadrado o la

corrección exacta de Fisher cuando fue necesario.

La variable dependiente fue el ratio de Hcy. Cuando empleamos pruebas paramétricas, transformamos el ratio de Hcy por medio de la fórmula:

LRH (logaritmo ratio Hcy)=Ln (ratio + 0.5), en donde Ln=logaritmo natural.

Adicionamos 0.5 unidades al ratio de Hcy para conseguir mayor ajuste a la distribución normal, ya que de este modo no obtuvimos puntuaciones extremas negativas. Si atendemos a la literatura, esperamos encontrar efectos en el genotipo en una dirección determinada. Para ganar suficiente potencia estadística, planificamos de antemano realizar contrastes unilaterales. El modelo puesto a prueba fue el logaritmo aditivo (logaditivo). Realizamos la transformación logarítmica del ratio y aplicamos la técnica de regresión lineal, considerando que los genotipos tenían puntuaciones: 0, 1 o 2, en función de los alelos de riesgo. A pesar de la transformación logarítmica (como consecuencia del escaso tamaño muestral), no logramos evaluar con precisión los supuestos paramétricos. Por este motivo, evaluamos de forma complementaria la relación entre el genotipo y la concentración de Hcy por medio del estimador Rho de Spearman y el test de tendencia de Jonckheere-Terpstra con los genotipos de riesgo. En ambos casos, aplicamos contraste unilateral.



RESULTADOS

1. Características principales de la población estudiada

Analizamos un total de 192 pacientes (86.7 % hombres) con EC documentada por angiografía e intervenidos mediante CRC. La edad media de los pacientes fue de 64.1 ± 7.4 años (Tabla 20). Obtuvimos información clínica exclusivamente de 45 individuos. Las características principales de los pacientes se reflejan en las tablas 20 y 21.

Tabla 20. Características de la población. Variables cualitativas

Variable	n (%)
Hombres	39 (87)
Antecedentes familiares de enfermedad coronaria (EC)	24 (53)
Tabaquismo (n=44)	
No fumador	10 (23)
Exfumador > 1 año	13 (29)
Exfumador < 1 año	10 (23)
Fumador	11 (25)
Dislipemia (n=43)	40 (93)
Hipertensión arterial (n=38)	34 (90)
Diabetes Mellitus (n=44)	22 (50)
Diabetes Mellitus tipo 1 (n=43)	4 (9)
Lesión del tronco de la arteria coronaria izquierda (CI)	8 (18)
Número de arterias coronarias afectadas	
Lesión del tronco de la CI exclusivamente	1 (2)
Lesión del tronco de la CI + EC de 1 vaso	2 (4)
Lesión del tronco de la CI + EC de 2 vasos	1 (2)
Lesión del tronco de la CI + EC de 3 vasos	4 (9)
EC de 1 vaso	1 (2)
EC de 2 vasos	9 (22)
EC de 3 vasos	27 (60)
Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI)	
30-49%	9 (20)
>49%	36 (80)
Clase funcional de la NYHA (n=44)	
II	40 (91)
III	4 (9)
Clase funcional de angina de la CCS (n=44)	
1	1 (2)
II	26 (59)
III	13 (30)
IV	4 (9)

NYHA (New York Heart Association); CCS (Canadian Cardiovascular Society).

2. Homocisteína plasmática total, homocisteína (S/N) unida a proteínas y su relación con los diferentes genotipos

La concentración media de tHcy en los 44 pacientes evaluados fue de 14.13 \pm 4.59 μ mol/L (Tabla 21).

Tabla 21. Características de la población. Variables cuantitativas.

Variable	Media ± DT	P ₅₀ (P ₂₅ - P ₇₅)	Min-Máx	KS (p)
Edad (años)	64.09 ± 7.44	67(58-70)	47-75	0.163(0.004)
IMC (kg/m²)	28.27 ± 4.49	27(26-30)	18-41	0.097(≥0.200)
CT (mg/dL)	159.67±6.30	146(129-187)	94-263	0.178(0.002)
LDL (mg/dL) n=44	88.50±37.12	79(63-109)	25-194	0.131(0.067)
HDL (mg/dL) n=44	40.23±10.24	39(34-45)	17-66	0.118(0.159)
Triglicéridos (mg/dL)	151.48±50.02	148(113-176)	52-278	0.097(≥0.200)
Lip-a (mg/dL) n=44	25.91±15.86	20(18-32)	6-73	0.187(0.001)
ApoA-1 (mg/dL) n=44	103.34±21.12	103(88-117)	58-145	0.059(≥0.200)
ApoB (mg/dL) n=44	80.82±26.75	76(63-96)	42-154	0.111(0.200)
CT/HDL (n=44)	4.19±1.43	3.75(3.21-4.68)	2.2-9.9	0.185(0.001)
tHcy (µmol/L) n=44	14.13±4.59	13.77(10.57-16.58)	7.5-28.1	0.134(0.057)
pCr (mg/dL) n=44	1.27±1.93	0.60(0.10-1.0)	0.0-9.8	0.332(0.000)
Fibrinógeno (mg/dL)	329.33±85.13	329.6(256.4-392.3)	167-565	0.098(≥0.200)
Urea (mg/dL)	43.73±15	40.0(34.0-50.0)	24-98	0.160(0.008)
Creatinina (mg/dL)	1.03±0.7	0.84(0.73-0.98)	0.5-4.2	0.314(0.000)
Ácido fólico (ng/mL)	8.32±3.57	8.38(5.80-9.49)	3.1-20.0	0.162(0.007)
Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	577.27±230.65	584.20 (379.93-662.50)	266-1319	0.185(0.001)

KS (Kolmogorov-Smirnov); IMC (índice de masa corporal); CT (colesterol total); LDL (lipoproteínas de baja densidad); HDL (lipoproteínas de alta densidad); Lip-a (lipoproteína a); ApoA-I (apolipoproteína A1); ApoB (apolipoproteína B); tHcy (homocisteína plasmática total); pCr (proteína C reactiva); ácido fólico (vitamina B₉); vitamina B₁₂ (cianocobalamina).

Aunque no existe un punto de corte específico para establecer la concentración de Hcy, se acepta como valor de referencia una concentración de tHcy en el plasma inferior a 15 µmol/L (5-15 µmol/L).

Sin embargo, la población adulta que no consume dieta rica en folatos presenta tHcy más elevada (15-20 μ mol/L). Por el contrario, los adultos que llevan un estilo de vida cardiosaludable y poseen niveles adecuados de vitaminas del complejo B, ostentan una concentración de tHcy \leq 12 μ mol/L^{145,150,450}

Definimos como HHcy el incremento de la tHcy en el plasma 451 . No obstante, existe cierta controversia a dicho respecto. Algunos autores consideran HHcy al valor de tHcy superior a 12 µmol/L 450 Si bien, otros reportes establecen que el rango fisiológico de tHcy no debería superar los 10 µmol/L 451 .

En la práctica se hace referencia indistintamente a la HHcy leve/moderada, cuando la concentración de tHcy (en estado de ayuno) se halla entre 12-30 µmol/L. Así mismo, se hace alusión a la HHcy intermedia, cuando los niveles de tHcy se encuentran entre 30-100 µmol/L. La HHcy severa se corresponde con valores de tHcy superiores a 100 µmol/L⁴⁵².

La concentración media de ácido fólico y cianocobalamina en los 45 pacientes estudiados fue de 8.32 ± 3.57 ng/mL y de 577.27 ± 230.65 pg/mL, respectivamente (Tabla 21).

Los valores de referencia del ácido fólico plasmático están comprendidos entre 6-20 ng/mL (9-41 mmol/L) y el rango normal de cianocobalamina oscila entre 200-900 pg/ml (148-664 pmol/L).

En nuestro estudio encontramos correlación inversa, aunque en el umbral de la significancia entre los niveles de ácido fólico y la concentración de tHcy (Rho = -0,113; p = 0.0665).

Asimismo, observamos correlación negativa aunque no significativa mediante estimaciones no paramétricas (Kruskal-Wallis/contraste unilateral), entre la concentración de tHcy y los niveles de cianocobalamina (Rho = -0,113; p = 0,238).

Pretendimos atender el efecto exclusivamente si se daba en la dirección esperada. Es decir, que si hubiéramos encontrado resultados en la dirección contraria, habríamos concluido la inexistencia de efectos (y no efectos en la dirección contraria).

La concentración media de tHcy varió en relación con el genotipo C677T MTHFR, presentando diferencia significativa (p = 0.011) (Tabla 22 y figura 73).

Tabla 22. Genotipo C677T MTHFR/Ala222Val [rs 1801133] y concentración media de homocisteína

Genotipo C677T MTHFR	Media	n	Desviación típica
TT*	17,70	4	2,94
CT	10,93	8	2,30
CC	12,70	11	3,92
Total	12,96	23	3,93

MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa); *Alelo de referencia; p = 0.011.

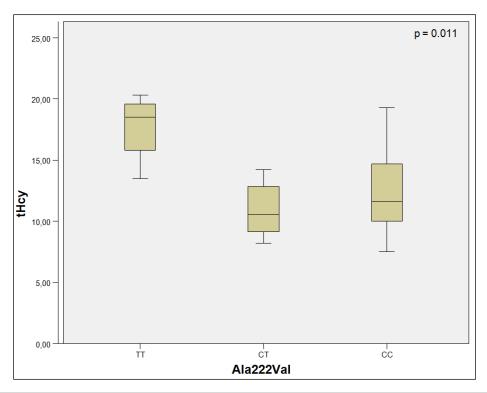


Figura 73. Genotipo C677T MTHFR/Ala222Val [rs 1801133] y concentración media de homocisteína. MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa); tHcy (homocisteína plasmática total).

No encontramos correlación entre la concentración de tHcy y los genotipos Gln192Arg (p = 0,386) y Met55Leu (p = 0.375) del gen PON1, mediante el *test* de Kruskall-Wallis. Tablas 23,24 y figuras 74,75 respectivamente.

Tabla 23. Genotipo Gln192Arg PON1 [rs 662] y concentración media de homocisteína

Genotipo Gln192Arg PON1	Media	n	Desviación típica
RR*	10,50	1	<u>-</u>
QR	11,75	12	2,48725
QQ	14,65	10	4,94576
Total	12,96	23	3,93215

^{*}Alelo de referencia; PON1 (paraoxonasa 1); p = 0.386.

Tabla 24. Genotipo Met55Leu PON1 [rs 854560] y concentración media de homocisteína

Genotipo Met55Leu PON1	Media	n	Desviación típica
LL*	12,67	7	4,52
LM	12,69	15	3,58
MM	18,90	1	-
Total	12,96	23	3,93

^{*}Alelo de referencia; PON1 (paraoxonasa 1); p = 0.375.

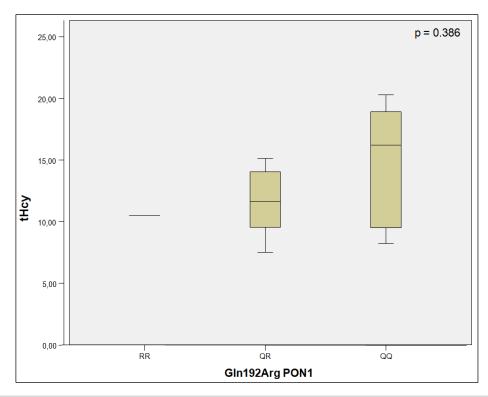


Figura 74. Genotipo Gln192Arg [rs 662] del gen PON1 y concentración media de homocisteína. PON1 (paraoxonasa 1); tHcy (homocisteína plasmática total).

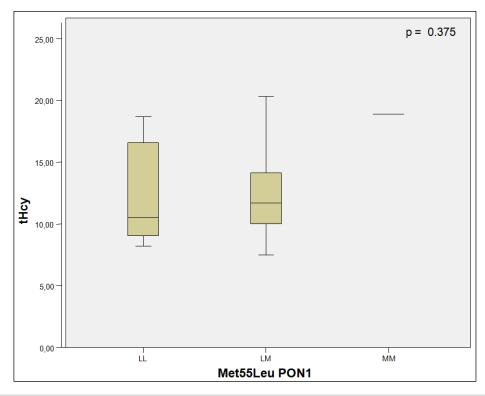


Figura 75. Genotipo Met55Leu [rs 854560] del gen PON1 y concentración media de homocisteína. PON1 (paraoxonasa 1); tHcy (homocisteína plasmática total).

Tampoco hallamos correlación (p = 0.270) entre el genotipo Cys311Ser del gen PON2 y la concentración de tHcy (Tabla 25 y figura 76). La concentración de tHcy varió de forma graduada entre los diferentes genotipos (Tablas 22-25 y figuras 73-76).

Tabla 25. Genotipo Cys311Ser [rs 7493] del gen PON2 y concentración media de homocisteína.

Genotipo Cys311Ser PON2	Media	n	Desviación típica
CC*	13,46	16	4,02
CS	11,81	7	3,73
Total	12,96	23	3,93

^{*}Alelo de referencia; PON2 (paraoxonasa 2); p = 0.270.

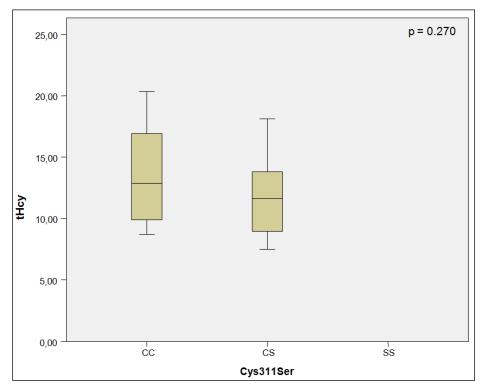


Figura 76. Genotipo Cys311Ser [rs 7493] del gen PON2 y concentración media de homocisteína. PON2 (paraoxonasa 2); tHcy (homocisteína plasmática total).

Definimos como positivo el hallazgo de S-Hcy-p cuando objetivamos su presencia en los homogeneizados vasculares de los fragmentos de AMI en al menos dos cromatogramas diferentes. Confirmamos la existencia de S-Hcy-p en 66/192 (34,38%) de los homogeneizados de la AMI analizados. Por el contrario, no identificamos N-Hcy-p en los homogeneizados de la AMI examinados por los métodos cromatográficos empleados (Figura 77).

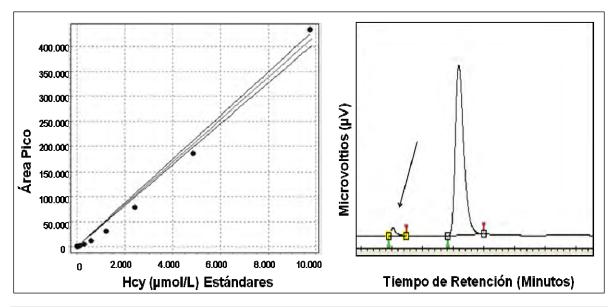


Figura 77. Análisis de la homocisteína unida a proteínas en la arteria mamaria interna. Izquierda. Calibración de la pendiente para el cálculo de homocisteína (Hcy) empleando hidrocloruro de cisteamina (2-mercaptoetilamina) como estándar interno (EI). Derecha. Cromatograma de la S-Hcy humana unida a proteínas (S-Hcy-p) en la arteria mamaria interna. Se muestran dos picos entre la Hcy (flecha) y el EI.

Aunque detectamos S-Hcy-p en el 34,38% (66/192) de los homogeneizados de AMI analizados, el número de casos representados en las diferentes tablas y figuras, es sensiblemente menor. Este hecho obedece a que inicialmente nuestro estudio comenzó con un número reducido de fragmentos de AMI.

Pese a que detectamos S-Hcy en una considerable cantidad de pacientes, una proporción significativa de estas muestras se emplearon en: 1. La determinación de S-Hcyp (y sus comprobaciones). 2. El cálculo de las proteínas de las muestras. 3. El análisis del genotipo. De otro lado, el número de pacientes en los cuales obtuvimos simultáneamente fragmentos de AMI y *punches* aórticos fue incluso más reducido. Esto como consecuencia de la tendencia quirúrgica creciente a utilizar injertos arteriales (especialmente de AMI unilateral y BIMA) y por ende, al uso de técnicas que obvian la anastomosis proximal de los injertos a la AA durante la CRC, fundamentalmente en pacientes con ATS avanzada de la aorta (*No-touch technique*). En este último subgrupo de enfermos, en los cuales obtuvimos del mismo paciente fragmentos de AMI y *punches* aórticos, evaluamos la

expresión de los genes eNOS, iNOS y DDAH2, además del grado de metilación del promotor del gen DDAH2. Finalmente, como es a bien saber, el análisis de los resultados obtenidos acarrea la exclusión de los casos perdidos y de los valores extremos (*outliers*). Así mismo, el número de muestras tanto de AMI como de los pares arteriales seleccionados (AMI + *punches* aórticos) en los cuales logramos concretar las valoraciones propuestas, variaron tanto para una muestra como para un par arterial específico.

Para ajustar las variaciones en la concentración de proteínas entre los distintos homogeneizados vasculares, determinamos el ratio de Hcy (expresado en pmol) dividido por la concentración de proteínas (expresada en mg). Evaluamos la distribución de la Hcy y de la concentración de proteínas, encontrando que ambas diferían significativamente de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov con la corrección de la significación de Lilliefors: p < 0.05). Por ende, transformamos las puntuaciones por medio de logaritmos (Log₁₀). Posteriormente aplicamos Log₁₀ a todas las puntuaciones de Hcy (puntuación + 0.5). Realizamos el análisis aplicando Log₁₀ dada la ausencia de normalidad. Empleamos el ratio de Hcy como la variable dependiente. Transformamos el logaritmo/el ratio de Hcy obteniendo de esta manera puntuaciones más cercanas a la normalidad (Kolmogorov-Smirnov con la corrección de la significación de Lilliefors: p > 0.05). El valor medio de la concentración de S-Hcy-p fue de 16.44 ± 31.5 μmol/L, con un ratio medio ajustado de 38.637 ± 6.918 (pmol/mg de proteínas). No observamos relación entre la concentración de tHcy y la concentración vascular de S-Hcy-p (p > 0.05).

La tabla 26 muestra los diferentes genotipos, sus respectivas frecuencias y porcentajes, el logaritmo del ratio de S-Hcy-p de acuerdo al genotipo, así como la frecuencia de S-Hcy-p encontrada en los polimorfismos analizados.

Tabla 26. Concentración de S-homocisteína en la arteria mamaria interna y su distribución por genotinos

Genotipo	Frecuencia (%)	Log del <i>ratio</i> S-Hcy (Media ± DT) ⁽¹⁾	S-Hcy-p (%) ⁽²⁾
Gln192Arg PON1 (rs 662)			
RR*	11(14.1)	2.87±1.7	4(36)
QR	30(38.5)	2.90±1.6	22(73)
QQ	37(47.4)	2.53±1.6	25(68)
Casos perdidos	2(2.5)		
Met55Leu PON1 (rs	_		
854560)			
LL	39(48.8)	2.32±1.6	22(56)
LM	38(47.5)	2.96±1.6	27(71)
MM	3(3.8)	3.76±2.0	2(67)
Casos perdidos	_ 0		
Cys311Ser PON2 (rs			
7493)			
CC	9(12)	2.51±1.8	4(44)
CS	26(32.5)	2.36±1.5	13(50)
SS	40(53.5)	2.95±1.6	33(83)
Casos perdidos	5(6.3)		
Ala222Val MTHFR (rs			
1801133)			
TT	11(14.1)	3.64±1.4	7(64)
CT	38(48.7)	2.73±1.7	24(63)
CC	29(37.2)	2.38±1.5	20(69)
Casos perdidos	2(2.5)		

*Alelo de referencia; PON1 (paraoxonasa 1); PON2 (paraoxonasa 2); MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa); ⁽¹⁾El ratio de S-homocisteína (S-Hcy) se estimó como pmol de S-Hcy unida a proteínas medido en mg y detectado en al menos dos cromatogramas diferentes del homogenizado vascular de un determinado fragmento de arteria mamaria interna; ⁽²⁾Frecuencia y porcentaje de la concentración de S-Hcy unida a proteínas (S-Hcy-p) hallada en un genotipo específico de los polimorfismos analizados; DT (desviación típica o estándar).

En este subgrupo de individuos en los que detectamos S-Hcy-p en los homogeneizados de AMI analizados (66/192), no hallamos correlación con la concentración de S-Hcy-p expresada como el ratio en los genotipos Gln192Arg PON1 (Rho = -.101; p = 0. 241) y Cys311Ser PON2 (Rho = .217; p = 0.65). Sin embargo, tanto el genotipo C677T MTHFR (Rho = -.247; p = 0.040), como el genotipo Met55Leu PON1 (Rho = .261; p = 0.032) contribuyeron significativamente a la variabilidad de la concentración de S-Hcy-p (Tablas 26,27 y figura 78).

En el subgrupo de pacientes en quienes obtuvimos información clínica exhaustiva y tHcy (n = 44), descritos en las tablas 20 y 21, detectamos S-Hcy-p en los homogeneizados vasculares de AMI en 14 sujetos. En este subgrupo de pacientes, la concentración media

de tHcy fue de $12.96 \pm 3.9 \ \mu mol/L$. A su vez, los niveles de ácido fólico se correlacionaron inversamente con la tHcy (Rho = -0.362; p = 0.04).

Tabla 27. Expresión de S-homocisteína en la arteria mamaria interna y su relación con los genotipos. Modelo del logaritmo aditivo.

Genotipo	Alelo de referencia	Modelo Log-aditivo	Modelo Log-aditivo p*	Rho de Spearman	Rho de Spearman p*	Jonckheere- Terpstra p*
Gln192Arg PON1	RR	255	.240	101	.241	.244
Met55Leu PON1	LL	.671	.047	.261	.032	.033
Cys311Ser PON2	CC	359	.158	.217	.065	.055
Ala222Val MTHFR	TT	560	.045	247	.040	.043

PON1 (paraoxonasa 1); PON2 (paraoxonasa 2); MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa); *La correlación es significativa a nivel 0.05 (contraste unilateral).

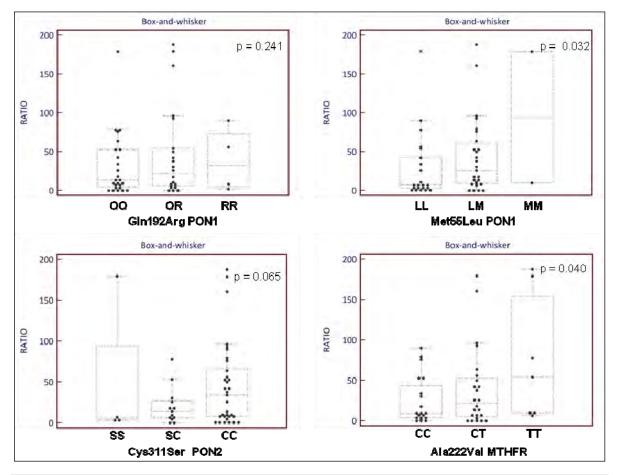


Figura 78. Expresión de S-homocisteína en la arteria mamaria interna y su relación con el genotipo. **Modelo del logaritmo aditivo.** Se presentan los valores originales de la variable *ratio* (contraste unilateral). PON1 (paraoxonasa 1); PON2 (paraoxonasa 2); MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa).

Mediante análisis de regresión lineal empleando pruebas paramétricas, al incluir los genotipos analizados, estimamos que la contribución general de los genotipos a la variación de la concentración de S-Hcy en los fragmentos de AMI estudiados, fue del 38.3 % (p = 0.007). En el modelo seleccionado, el genotipo Gln192Arg PON1 se excluyó de la ecuación:

Log10 (Concentración*) = 1.9875 + 0.974 x alelos T + 0.942 x alelo

M, en donde:

*es la concentración de S-Hcy en fragmentos de arteria mamaria

interna (AMI).

Log es el logaritmo natural

La concentración de S-Hcy es el nivel de S-Hcy/Cantidad de

proteínas

Alelos T = 0, 1 ó 2, según el número de alelos T que tenga el

genotipo

Alelo M = 1 si el genotipo Met55Lev PON1 = LM ó MM

Alelo M = 0 si el genotipo Met55Leu PON1 = LL

Por cada alelo de riesgo del genotipo Met55Leu PON1 y del genotipo C677T MTHFR, se incrementó la concentración de S-Hcy en $0.505~\mu mol/L$ (p = 0.025). De igual forma, por

cada alelo de riesgo de los genotipos Met55Leu PON1, Cys311Ser PON2 y C677T MTHFR, se aumentó la concentración de S-Hcy en 0.360 µmol/L (p = 0.036) (Figura 79).

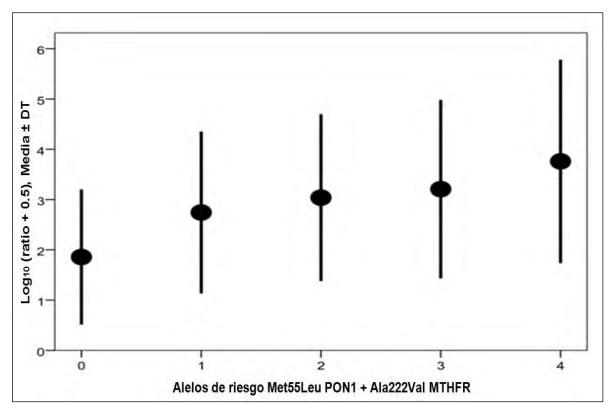


Figura 79. Relación entre la concentración de S-homocisteína en la arteria mamaria interna y los genotipos de riesgo. Gráfica de la media ± la desviación típica. DT (desviación típica o estándar); ratio (S-Hcy/Cantidad de proteínas); S-Hcy (S-homocisteína); PON1 (paraoxonasa 1); MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa).

3. Diferencias en la expresión génica entre los territorios arteriales

Comparamos la expresión de los genes eNOS, iNOS y DDAH2, en relación con los diversos genotipos y según la estructura vascular evaluada (AMI *versus* aorta) (Tabla 28 y figuras 80-82, respectivamente). La media de la expresión del gen eNOS entre los diferentes fragmentos arteriales analizados, presentó una elevada correlación (Rho = 0.619; p = 0.001). Pese a ello, la diferencia no alcanzó significancia (p > 0.05). Adicionalmente, observamos una discreta disminución en la media de la expresión del gen eNOS en los *punches* aórticos con respecto a la apreciada en los fragmentos de AMI (Figura 80).

Tabla 28. Expresión de los genes eNOS, iNOS y DDAH2, según el genotipo y el territorio arterial evaluado

evaluado							
Genotipo	n (%)	AMI	AMI	AMI	Aorta	Aorta	Aorta
		eNOS	iNOS	DDAH2	eNOS	iNOS	DDAH2
PON192							_
RR*	9(24.3)	0.12±0.81	0.37±1.09	144±93.7	0.27±0.42	-0.47±0.43	186±136
QR	13(35.1)	0.04±0.83	0.30±0.75	208±131	0.16±0.42	-0.15±0.76	458±475
QQ	15(40.5)	-0.14±1.25	-0.02±1.13	266±159	-0.18±0.48	-0.73±0.57	516±508
Perdidos	3(7.5)						
P ⁽¹⁾		0.147	0.183	0.032	0.011 ⁽²⁾	0.096	0.055
PON55							
LL	22(57.9)	07±1,08	-0.02±1.10	244±168	0.17±0.39	-0.50±0.71	460±473
LM	14(36.8)	0.,11±0,68	0.36±0.62	200±110	-0.13±0.55	-0.42±0.61	376±434
MM	2(5.3)	0,22±0.64	0.83±1.78	195±118	0.31±0.53	-0.27	272±187
Perdidos	3(7.3)						
p ⁽¹⁾		0.398	0.129	0.413	0.140	0.191	0.268
PON2							
SS	21(58.3)	-0.10±0.71	0.22±0.96	181±105	0.05±0.56	-0.28±0.76	343±368
CS	10(24.4)	0.24±1.29	0.01±1.12	246±185	0.03±0.43	-0.67±0.36	511±585
CC	5(12.2)	-0.12±0.99	0.48±0.91	307±145	0.12±0.30	-0.76±0.57	522±425
Perdidos	5(12.2)						
p ⁽¹⁾		0.067	0.227	0.076	0.494	0.013	0.15
MTHFR							
TT	7(17.1)	0.34±0.81	0.57±1.12	166±97.8	-0.07±0.43	-0.31±0.35	207±158
CT	20(48.8)	0.07±0.81	0.19±0.53	233±161	0.07±0.40	-0.38±0.71	382±371
CC	11(26.8)	-0.36±1.15	-0.09±1.35	271±156	0.14±0.63	-0.68±0.64	675±614
Perdidos	3(7.3)						
p ⁽¹⁾		0.246	0.408	0.231	0.069	0.113	0.056
+411		(1) - , ,	=	(2).			

*Alelos de referencia; $^{(1)}$ Test de Jonckheere-Terpstra; $^{(2)}$ La correlación es significativa al nivel 0.05 (contraste unilateral); eNOS (sintasa endotelial del óxido nítrico); iNOS (sintasa inducible del óxido nítrico); DDAH2 (dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2); AMI (arteria mamaria interna); PON1 (paraoxonasa 1); PON2 (paraoxonasa 2); MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa). El resultado se expresa como el valor de la media \pm la desviación típica. eNOS e iNOS transformado = Log10 (eNOS). En caso de que sea 0, se ha sustituido por el valor 0.001(-3).

El valor medio de la expresión del gen iNOS fue ligeramente inferior en los *punches* aórticos con respecto al valor medio observado en los fragmentos de AMI. Esta diferencia no alcanzó significancia estadística (Figura 81).

Encontramos diferencia significativa en la expresión del gen DDAH2 entre los diferentes fragmentos arteriales (AMI *versus punches* aórticos) objeto del estudio (Figura 82). Observamos incremento en la expresión del gen DDAH2 en los *punches* aórticos en comparación con los fragmentos de AMI (p < 0.001).

No hallamos diferencias significativas en la expresión de los genes eNOS e INOS en relación con los polimorfismos Met55Leu PON1 y C677T MTHFR en los fragmentos de

AMI, ni en los *punches* aórticos. No obstante, encontramos que la expresión del gen DDAH2 parece depender del genotipo C677T MTHFR. Empleando un modelo logarítmico lineal no paramétrico, la contribución del genotipo C677T fue significativa (p = 0.036). Adicionalmente, observamos una expresión graduada del gen eNOS en relación con la variante Gln192Arg PON1 (p = 0.011) en los *punches* aórticos. Apreciamos dicha contribución de los genotipos a la variación en la expresión génica en la aorta, pero no en la AMI.

Si bien no alcanzó la significación estadística, observamos una graduación de la expresión de los genes eNOS y DDAH2 en función de los genotipos que codifican la enzima MTHFR en el umbral de la significación: p=0.069 y p=0.056, respectivamente (Tabla 28).

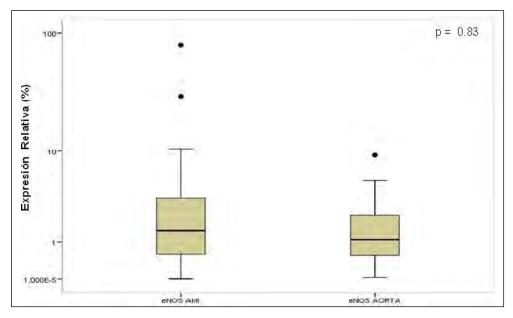


Figura 80. Expresión del gen eNOS en la arteria mamaria interna y la aorta. eNOS (sintasa endotelial del óxido nítrico); AMI (arteria mamaria interna).

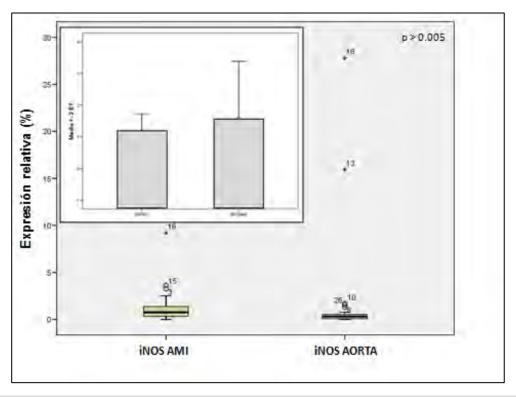


Figura 81. Expresión del gen iNOS en la arteria mamaria interna y la aorta. iNOS (sintasa inducible del óxido nítrico); AMI (arteria mamaria interna).

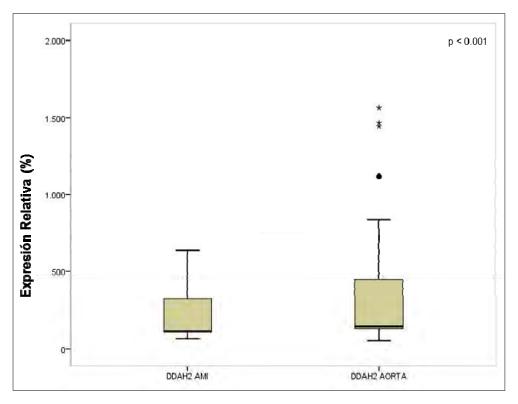


Figura 82. Expresión del gen DDAH2 en la arteria mamaria interna y la aorta. DDAH2 (dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2); AMI (arteria mamaria interna).

4. Concentración de tHcy, S-homocisteína y grado de metilación del promotor del gen DDAH2

Determinamos el grado de metilación de las islas CpG del promotor del gen DDAH2 mediante nMSP (*nested Methylation Specific PCR analysis*). Figura 83.

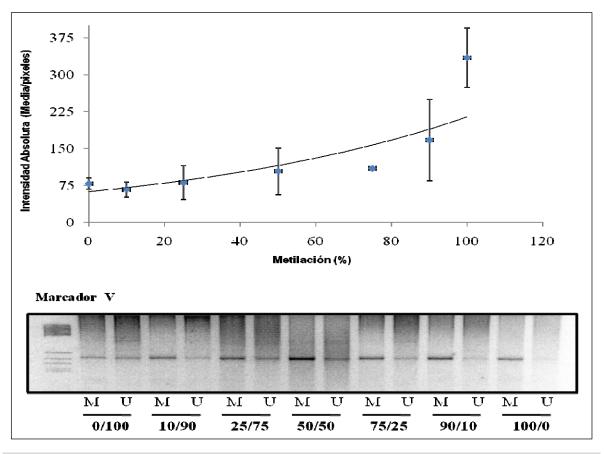


Figura 83. Evaluación del grado de metilación de las islas CpG del promotor del gen DDAH2 mediante nMSP. Curva estándar obtenida después de confrontar la intensidad absoluta de las bandas, con el porcentaje de DNA no metilado (*U-unmethylated*) y/o completamente metilado (*M-fully methylated*). El DNA que se extrajo de las muestras de la arteria mamaria interna y el DNA de las mezclas de los estándares (mezclados en diferentes proporciones), se modificaron con bisulfito y posteriormente se amplificaron mediante PCR anidada. nMSP (*nested Methylation Specific PCR analysis*). PCR (*polymerase chain reaction*). DDAH2 (dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2); DNA (ácido desoxirribonucleico).

Observamos correlación negativa aunque no significativa, entre la tHcy y el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 en los fragmentos arteriales analizados (AMI *versus punches* aórticos). Sin embargo, dicha correlación se mantuvo en el umbral de la significación en los *punches* aórticos (p = 0.055) (Tabla 29).

Tabla 29. Correlación entre tHcy, S-Hcy y metilación del promotor del gen DDAH2 en la arteria mamaria interna y la aorta

Clase de homocisteína	Grado de metilación del promotor del gen DDAH2			
	AMI	Aorta		
tHcy				
Rho ⁽¹⁾	-0.429	-0.714		
P	0.198	0.055		
N	6	6		
S-Hcy-p				
Rho	0.486	0.829*		
P	0.169	0.021		
N	6	10		

tHcy (homocisteína plasmática total); S-Hcy (S-homocisteína); DDAH2 (dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2); AMI (arteria mamaria interna); S-Hcy-p (S-Hcy unida a proteínas); (1)Rho de Spearman; *La correlación es significativa al nivel 0.05 (contraste unilateral).

Cuando comparamos el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 en los punches aórticos con respecto a los fragmentos de AMI, la diferencia fue significativa (p = 0.012) (Figura 84).

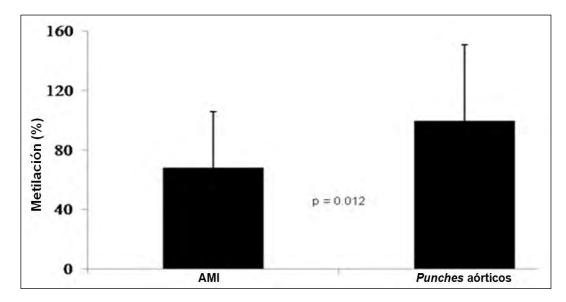


Figura 84. Metilación de las islas CpG del promotor del gen DDAH2 en la arteria mamaria interna y la aorta. Diferencia significativa en el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 entre la AMI y la aorta (p=0.012). DDAH2 (dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2); AMI (arteria mamaria interna).

No hallamos relación entre la concentración de S-Hcy-p y el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 en los fragmentos de AMI (Tabla 29 y figura 85). Asumiendo que la concentración de Hcy-p en los fragmentos aórticos no debería diferir más allá que de la proporción de Hcy-p encontrada en la AMI, correlacionamos la Hcy-p de la AMI con el

grado de metilación del promotor del gen DDAH2 en los *punches* aórticos. Encontramos asociación positiva y significativa entre la concentración de S-Hcy-p y el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 en los *punches* aórticos (Rho = 0.829, p = 0.021, n= 10). Esta correlación se representada en la tabla 29 y la figura 85.

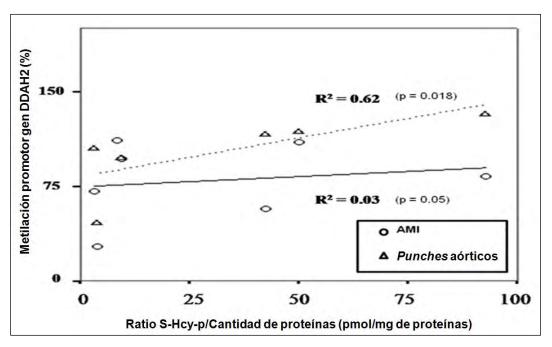


Figura 85. Correlación significativa entre la S-Hcy-p y el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 en los *punches* aórticos. p = 0.018; R² (Coeficiente de correlación lineal de Pearson); DDAH2 (dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2); S-Hcy-p (S-homocisteína unida a proteínas).

5. Grado de metilación del promotor del gen DDAH2 y expresión de los genes eNOS y DDAH2

Cuando estudiamos los fragmentos de AMI y los *punches* aórticos, no apreciamos relación significativa entre el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 y la expresión del gen DDAH2. No obstante, el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 se correlacionó positiva y significativamente con la expresión del gen eNOS (Rho = 0.563; p = 0.003). Observamos dicha correlación en los *punches* aórticos, pero no en los fragmentos de AMI (Tabla 30).

Tabla 30. Correlación entre el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 y la expresión de los genes DDAH2, eNOS e iNOS, en la arteria mamaria interna y la aorta.

Grado de metilación del promotor del gen DDAH2	Expresión génica		
	Gen DDAH2	Gen eNOS	Gen iNOS
AMI			
Rho ⁽¹⁾	-0.125	0.126	-0.165
p	0.329	0.283	0.226
n	15	23	23
Aorta			
Rho	0.235	0.563*	0.246
p	0.209	0.003	0.136
n	14	23	22

⁽¹⁾ Rho de Spearman; *La correlación es significativa al nivel 0.05 (contraste unilateral); DDAH2 (dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2); eNOS (sintasa endotelial del óxido nítrico); iNOS (sintasa inducible del óxido nítrico); AMI (arteria mamaria interna).



DISCUSIÓN

En el presente estudio, observamos que la estimación de la S-Hcy-p constituye una estrategia efectiva en la valoración del grado de metilación del promotor del gen DDAH2. Adicionalmente encontramos que la unión de la S-Hcy-p a la pared de la AMI, depende además de la tHcy, de la concentración de la enzima PON1 (enzima vinculada a la actividad de las HDL), la cual se encuentra a su vez determinada parcialmente por la variante Met55Leu del gen PON1. La contribución relativa de las observaciones descritas fue menor en los fragmentos de AMI que en los *punches* aórticos.

Apreciamos que la concentración de S-Hcy-p en la AMI no se correspondió con la tHcy. En estudios previos se ha referido que la tHcy se correlaciona débilmente con la Hcy en la pared de la AMI y de la vena safena⁴⁵³. Nuestros hallazgos en la AMI avalan los resultados de estos investigadores, quienes sugirieron que la Hcy en la pared vascular se comporta de forma parcialmente independiente a como lo hace en el plasma. Por el contrario, Perna y cols.⁴⁴⁸, señalaron que la tHcy y la S-Hcy-p se correlacionan en los pacientes urémicos y en los controles.

En nuestro estudio no hallamos N-Hcy-p en los homogeneizados de AMI. Debido a que la ausencia de N-Hcy-p en la AMI ha sido ciertamente sorprendente, consideramos pertinente exponer diferentes planteamientos que expliquen dicho hallazgo:

- 1. Es probable que la concentración de N-Hcy-p en la AMI estuviese por debajo del umbral de detección cromatográfico, más que una falta real de N-Hcy-p, debido a la escasa cantidad de tejido de AMI disponible. Se ha descrito que la Hcy-T se detecta en el plasma humano en concentraciones ~30 veces más bajas que la tHcy.
- 2. El empleo de agentes reductores como la trifenilfosfina (TPP) y el DTT, puede haber contribuido a la falta de detección de N-Hcy-p en la AMI.

- 3. Sin embargo, al margen de las anteriores observaciones, consideramos que la falta de N-Hcy-p en la AMI está relacionada con el incremento de su plasticidad homeostática, lo que evitaría la unión de la S-Hcy-p a la pared vascular.
- 4. Ya que en nuestro estudio la concentración de S-Hcy-p se correlacionó significativamente con los genotipos C677T MTHFR y Met55Leu PON1, es factible que estas variantes favorezcan la unión de la S-Hcy-p a la pared vascular.

Hallamos relación entre el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 y la S-Hcy-p en los *punches* aórticos, pero no en los fragmentos de AMI. No obstante, la S-Hcy-p no se correlacionó con la expresión del gen DDAH2 en ninguno de los territorios analizados (AMI y *punches* aórticos). Si bien, el genotipo C677T MTHFR contribuyó significativamente a la expresión del gen DDAH2 en los fragmentos de AMI. De otro lado, el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 no se correspondió con la expresión del gen DDAH2 en ninguno de los territorios arteriales evaluados. A diferente grado de metilación del promotor del gen DDAH2, la correlación con la expresión del gen eNOS en los *punches* aórticos fue negativa, pero esta fue positiva en los fragmentos de AMI. Por otra parte, la tHcy se relacionó positivamente con la expresión del gen eNOS, tanto en los fragmentos de AMI como en los *punches* aórticos.

Teniendo en cuenta estos hallazgos, consideramos que la S-Hcy-p, más que la tHcy, constituye un mejor parámetro del grado de metilación del promotor del gen DDAH2. Asimismo, el análisis de los datos sugiere un mecanismo que relaciona la S-Hcy-p, el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 y la expresión del gen eNOS, el cual parece ser independiente de la vía DDAH2/ADMA/eNOS/NO⁻. Este mecanismo contribuye a explicar la discrepancia de los hallazgos encontrados entre la aorta y la AMI, en la que estos cambios parecen ser menos relevantes. La relación descrita entre la S-Hcy-p y el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 (a concentraciones fisiológicas de Hcy), no había sido reportada previamente *in vivo*. Dicho hallazgo ha sido observado *in vitro*,

exclusivamente al exponer las células a elevadas concentraciones de Hcy²⁵. El hecho de haber encontrado correlación entre S-Hcy-p y el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 en ausencia de alteración de la expresión del gen DDAH2, justifica su independencia de la vía DDAH2/ADMA/eNOS/NO⁻ y sugiere la participación de otros genes como el gen DDAH1, el cual regula la concentración plasmática de ADMA, como se demostró recientemente⁴⁵⁴.

Existen diferentes argumentos que explican la asociación descrita entre el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 y la expresión del gen eNOS con independencia de la expresión del gen DDAH2. En primer término, nuestro estudio presenta algunas limitaciones. El pequeño tamaño de la muestra pudiese explicar la ausencia de correlación por sí misma, en concordancia con otros determinantes transcripcionales no evaluados. Se ha descrito en estudios *in vitro*, que en condiciones de HHcy (tHcy >100µmol/L) la metilación del promotor del gen DDAH2 disminuye la expresión del gen DDAH2, con el consecuente incremento de ADMA²⁵. Incluso, en condiciones de HHcy, diferentes autores han reportado hallazgos contradictorios. La exposición a concentraciones de Hcy por encima de 100µmol/L disminuye la producción de NO´, con independencia de los niveles de ADMA o de la expresión del mRNA de los genes DDAH1 o DDAH2. Estos hallazgos sugieren que la ADMA no es el principal mediador de la disfunción del endotelio vascular promovida por la HHcy *in vivo*²³. En segundo lugar, existen otros mecanismos que pueden explicar la relación entre el grado de metilación del gen DDAH2 y la expresión del gen eNOS, independientemente de la expresión del gen DDAH2.

Nuestros resultados avalan la hipótesis de que la Hcy a concentraciones fisiológicas ejerce un efecto directo sobre la vía de la señalización DDAH2/ADMA/eNOS/NO^{*}. Stühlinger y cols.¹⁴⁴, observaron que en las células endoteliales bovinas sometidas a concentraciones de Hcy equivalentes a la encontrada en la HHcy moderada (30 µmol/L), la exposición a diferentes concentraciones de DL-Hcy, se relacionaba de forma dosis

dependiente con incremento de ADMA y disminución de la actividad de las DDAH. Estos autores, observaron que la Hcy no modificaba la expresión del gen DDAH1. Aunque los investigadores no evaluaron los efectos de la Hcy sobre las diferentes isoformas de las DDAH, concluyeron que la Hcy inducía cambios en la expresión del gen DDAH2. Sin embargo, la reciente caracterización de una cepa murina con deficiencia en la expresión del gen DDAH1, ha dejado en evidencia que la enzima DDAH1 es esencial en el metabolismo de la ADMA y de la L-NMA *in vivo*; a diferencia de la enzima DDAH2, a la cual no se le ha atribuido actividad en la degradación, ni de la ADMA, ni de la L-NMA⁴⁵⁴. Por consiguiente, la acción que hemos atribuido a la concentración de S-Hcy-p en la expresión del gen eNOS, pudiera ser explicada por mecanismos no evaluados que actúan más sobre el gen DDAH1, que sobre el gen DDAH2.

En el actual trabajo, el polimorfismo C677T MTHFR surge como marcador de la expresión del gen DDAH2 de forma independiente a la concentración de S-Hcy-p. Sohn y cols. 354, en estudios realizados tanto *in vivo*, como *in vitro*, sugirieron que el impacto funcional de la variante C677T MTHFR se hace manifiesto exclusivamente cuando coexisten bajos niveles de folatos. No obstante, diferentes investigadores han reportado hallazgos contrapuestos y grados de metilación específicos en ciertas células, que no guardan relación con la concentración sérica de folatos. Nuestros resultados sugieren que la variante C677T actúa como marcador de la expresión del gen DDAH2, con independencia parcial de su ya reconocida alteración de la actividad de la enzima MTHFR, en concordancia con las observaciones expuestas por estos investigadores.

Concurren suficientes evidencias en la literatura que avalan la HHcy como FR independiente en la aterogénesis¹³. Los beneficios de la terapia de la HHcy ratifican la importancia de la valoración de la Hcy en la práctica clínica. Pese a ello, la relevancia clínica de diferentes formas de Hcy que pudiesen estar involucradas en la génesis de diversos procesos homeostáticos del organismo, se desconoce. Algunos estudios han

mostrado que tanto la Hcy reducida, como la Hcy en su forma más perjudicial (la Hcy-T), alteran la coagulación sanguínea, la fibrinólisis y la actividad biológica de las plaquetas^{17,18}. Debido a que la Hcy-T constituye químicamente un compuesto altamente reactivo, la Hcy-T reacciona rápida y ávidamente con el grupo amino-ε de los residuos de lisina de las proteínas, conformando amidas más estables como las homocistamidas o las N-Hcy-p. El proceso de N-Hcy-p ha sido documentado en diversas proteínas¹⁷. Si bien, no todas las proteínas plasmáticas se encuentran homocisteiniladas. Por ejemplo, no se ha encontrado N-Hcy-p en la prealbumina del plasma humano inclusive en pacientes con HHcy, aunque esta proteína contiene siete residuos de lisina⁴⁵⁵. Algunos estudios han reportado falta de N-Hcy-p inclusive en presencia de una proporción representativa de S-Hcy-p en varias proteínas plasmáticas⁴⁵², entre ellas en la Apo-B de las LDL⁴⁵⁶. También se ha descrito que la S-Hcy-p incrementa la aterogenicidad de las lipoproteínas⁴⁵⁶.

Existe creciente interés la caracterización de hacia las proteínas S/N homocisteiniladas como marcadores biológicos de las ECV. Encaminados hacia este propósito, evaluamos el grado de alteración de las proteínas de la pared vascular en fragmentos de AMI y aorta extraídos de pacientes con HHcy leve, a quienes se les realizó CRC. Dos estructuras vasculares estas, cuya historia natural ha evidenciado predisposición contrapuesta al desarrollo de ATS, propia de la aorta y las arterias coronarias, pero "ajena" a la AMI. Una estructura vascular frágil en su apariencia macroscópica, que contrasta con su reconocida resistencia intrínseca a la ATS y que ha mantenido absortos a cirujanos y científicos por décadas.

Los vasos sanguíneos humanos difieren en su predisposición a la ATS^{6,392}. Indagando acerca de los mecanismos que justifican la inmunidad relativa de la AMI frente a la aterogénesis, algunos autores han contrastado la reactividad de la pared vascular y la expresión génica de la AMI con la de la vena safena⁴⁰⁷. La resistencia a largo plazo de los injertos de AMI a la ATS, en comparación con los injertos de vena safena, ha sido atribuida

al menos en parte, a su mayor actividad endotelial⁴⁰⁶. Asimismo, diferentes investigadores han propuesto una serie de argumentos para aducir la resistencia de la AMI a la ATS (Tabla 15).

En la presente monografía, concluimos que la Hcy unida a la pared vascular, presenta un comportamiento diferente al de la tHcy. En la AMI, las características de unión de la S-Hcy a la pared vascular parecen depender de los genotipos C677T MTHFR y Met55Leu PON1. La ausencia de N-Hcy-p en la AMI y su menor afectación en el grado de metilación inducida por la Hcy con respecto a los punches aórticos analizados, sugiere que en la AMI existe una regulación más precisa del proceso homeostático. Asimismo, cuando comparamos los diferentes territorios arteriales, concluimos que la variante C677T MTHFR se asocia a mayor grado de metilación celular tejido-específica. Adicionalmente, en los fragmentos aórticos evaluados, el grado de metilación y los cambios en la expresión del parcialmente independientes de eNOS, parecen ser al menos vía DDAH2/ADMA/eNOS/NO1.



PERSPECTIVA "TRASLACIONAL"

1. Medicina e investigación "traslacional"

Actualmente se asume que la investigación es una actividad predominantemente colectiva⁴⁵⁷, por consiguiente, los esfuerzos cooperativos representan una forma de trabajo que permite el avance científico. Esto es así en todas las disciplinas biomédicas y también en la práctica médica, nuestro campo de acción. El trabajo en equipo, la difusión de la información y por lo tanto del conocimiento, involucra a los profesionales y a los receptores del cuidado médico, representando el ciberespacio un medio idóneo para la comunicación y el intercambio^{458,459}. En los últimos años, se ha tratado de que este espíritu colaborativo se convierta en el enfoque primordial de la investigación actual.

La brecha que separa la investigación biomédica básica (fundamental) y la aplicación clínica, se acrecienta día a día. A pesar de la expansión en el conocimiento de los procesos biológicos, estos no se traducen en nuevas terapias. En el ámbito académico, tampoco se explica porque el conocimiento adquirido en la investigación en ciencias básicas, ha tenido tan escasa repercusión en la clínica. Los trabajos realizados en animales de experimentación, los estudios *in vitro* y los ensayos clínicos, no reflejan los acontecimientos reales de los pacientes, de tal modo que prevean con certeza, la eficacia y la seguridad de las nuevas terapias. La aplicación de los últimos conocimientos científicos en la práctica clínica, debe entenderse como una nueva forma de investigación, a la que se ha denominado investigación "traslacional" con un objetivo tan simple de definir, como difícil de conseguir: "facilitar la transición de la investigación básica (animal e *in vitro*), en aplicaciones que redunden en beneficios de la salud" 460-462.

Hoy en día es ineludible que los profesionales de las ciencias de la salud asuman una visión amplia y moderna de la investigación fundamentada en aquellas nociones que les permitan aplicar los conocimientos de las ciencias básicas (fundamentales), vis a vis, en beneficio de los enfermos y con mira a la medicina individualizada. El compromiso del Sistema Nacional de Salud (SNS), a través de sus diferentes administraciones, es vital en la promoción de proyectos de investigación y el fomento de grupos multidisciplinarios de investigación "traslacional" en los hospitales. Recíprocamente, desde estas instituciones la actividad investigadora exige e incita a la administración a trabajar a su lado, facilitando los medios y la formación en esta disciplina. El esfuerzo en equipo permite que la comunidad se favorezca de los avances científicos y que bilateralmente, desde la práctica clínica se desplieguen iniciativas científicas innovadoras en la asistencia a los ciudadanos, tanto en la salud como en la enfermedad. En definitiva, nuestro compromiso como profesionales de las ciencias médicas, es obtener de la investigación un beneficio tangible para la sociedad. Sin el ímpetu permanente de los científicos, por el ahínco en el conocimiento y en la aplicación de sus logros en la reverta contra las enfermedades, el SNS no avanzaría.

2. Investigación fundamental (básica) e investigación clínica

Durante décadas se han hecho esfuerzos para unir estas dos vertientes del espectro (investigación básica e investigación clínica) y lograr transformar los hallazgos del laboratorio en terapias cada vez más eficientes. Diferentes instrumentos procedentes de la investigación básica se vienen abriendo frente en la medicina cardiovascular moderna. Entre estas herramientas se cuentan: la farmacogenómica⁴⁶³, los nuevos biomarcadores, las revolucionarias técnicas de imagen, la terapia génica y la epigenómica^{55,309}.

La investigación básica ha evolucionado considerablemente en los últimos años y se encuentra capacitada para dar el paso; "from bench to bedside", hacia la medicina e investigación "traslacional". Sin embargo, es perentoria una comunicación fluida y

permanente entre la investigación básica y la investigación clínica, para que se pueda llevar a buen término, una investigación "traslacional" real y efectiva. La necesidad de sortear esta dificultad, es sustancialmente apremiante en la medicina cardiovascular, debido a la enorme trascendencia de las ECV. La medicina "traslacional" está por lo tanto dirigida a amortizar en beneficio social, médico y económico, todo el esfuerzo dedicado a la investigación básica preclínica⁴⁶⁰. Este fue el objetivo que dio lugar en los EE.UU, a la iniciativa *Critical Path* de la FDA (*Food and Drug Administration*) y a la reorientación de la financiación de los NIH (*National Institutes of Health*) hacia los centros de medicina "traslacional" 464-466.

Las entidades que integran la investigación básica y clínica a nivel asistencial, son las instituciones idóneas para realizar investigación "traslacional" 460,467. En consecuencia, la investigación "traslacional" no puede efectuarse en los departamentos de las universidades, ni en los centros dedicados exclusivamente a la investigación, ya que en estas entidades, la investigación clínica no se desarrolla plenamente por adolecer de centros hospitalarios. En España, existen pocos grupos que hacen investigación "traslacional" en la propia institución, además de ser insuficientes y estar dicha actividad concentrada en tópicos muy selectos. El deseo de mejorar la investigación "traslacional" ha dejado en evidencia grandes dificultades en esta interfase. Al igual que en otros retos de la ciencia, la clave que abre las puertas al éxito de la investigación "traslacional", está en el perfeccionamiento de los métodos y en la idoneidad de los sistemas que permitan aproximar el salto: "from bench to bedside" 460-462.

3. Investigación cardiovascular "traslacional"

La investigación cardiovascular "traslacional" incorpora este nuevo modelo de investigación, en el que se pondera la estrecha colaboración entre los investigadores en ciencias básicas y los investigadores nacionales e internacionales del ámbito clínico, a

más de la implementación de una red de centros clínicos que permitan que el conocimiento adquirido, se transforme de manera eficiente en beneficios de salud reales para la sociedad (Figura 86). La excelencia en este campo requiere, por tanto, un contacto permanente con los centros en los cuales se realiza la práctica clínica diaria⁴⁶⁷.

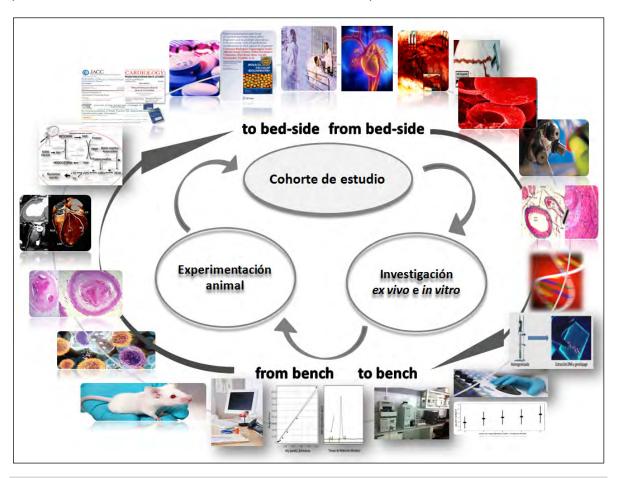


Figura 86. Investigación cardiovascular "traslacional". La esencia de la investigación biomédica, es la transferencia del conocimiento generado en los laboratorios de investigación básica, hacia el perfeccionamiento de la práctica medica diaria y recíprocamente, desde la clínica hacia el estímulo de la investigación sobre las inquietudes científicas generadas en los centros asistenciales.

En el ámbito cardiovascular, la necesidad de aproximar la investigación básica y clínica, surgió recientemente con los primeros estudios que validaban nuevos tratamientos biológicos en la práctica clínica⁴⁶⁰. No obstante, a pesar del ingente esfuerzo realizado en las últimas décadas, siguen existiendo limitaciones substanciales en el estudio de las ECV, por lo que se viene imponiendo este nuevo enfoque conceptual⁵⁶. Durante el último lustro, la incursión de la terapia celular, ha promovido un nexo indispensable entre clínicos,

biólogos, bioquímicos y diferentes profesionales de las ciencias de la salud⁴⁶⁰. En esta senda, son tres los artífices del avance de la biomedicina, hacia los tratamientos individualizados: pacientes, clínicos e investigadores. Este ánimo colaborativo, constituye el enfoque primordial de la investigación cardiovascular actual. Pese a ello, el vínculo entre la medicina clínica y la investigación básica sigue siendo precario. En España, en los últimos años, la puesta en marcha del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)^{467,468}, a través de la iniciativa del Instituto de Salud Carlos III⁴⁶⁹, el frenesí de la Fundación Jiménez Díaz y de las diferentes Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en las ECV⁴⁶⁹⁻⁴⁷¹, representan una clara postura en esta dirección⁴⁶⁰.

Nuestra comprensión de la ATS, demanda el abordaje de diversos aspectos, como los estudios epidemiológicos, los trabajos de investigación en ciencias básicas y los ensayos clínicos. En la investigación básica, se ha progresado considerablemente en el análisis molecular de los determinantes genéticos de gran número de procesos, sus interacciones, los mecanismos relacionados con la transcripción génica, las vías de señalización molecular, los mecanismos moleculares implicados en el estado funcional de la cromatina y su contribución al entendimiento de las enfermedades (epigenómica). Información ésta, que ha de proporcionar nuevas evidencias en el desarrollo y la función de diferentes órganos y sistemas.

En el contexto de la ATS, además de la complejidad añadida que implica la integración y el abordaje de todos estos aspectos, la mayor dificultad estriba en su aplicación en la práctica clínica diaria. La búsqueda de FRECV no convencionales y de los determinantes genéticos que subyacen a la EC, son cruciales en la investigación de nuevos nexos con la enfermedad aterosclerótica 105,107. Las alteraciones genéticas suceden paulatinamente, lo cual contrasta con el dinamismo del epigenoma, el cual se ve afectado por diferentes aspectos del desarrollo y del entorno, al que está expuesto sucesivamente

el organismo^{337,338}. Los fenómenos epigenéticos son críticos en la expresión de los genes involucrados en la aterogénesis^{285,360}. La alteración de la expresión de ciertos genes, más que los fenómenos mutacionales, inducen y establecen la evolución de las ECV⁵⁵. Por consiguiente, nuestra habilidad para controlar la expresión de estos genes y las dianas específicas de algunos tipos celulares, permitirán mejorar nuestra comprensión del proceso aterosclerótico. Es inexcusable profundizar en la comprensión de tan complejo escenario. La respuesta de los genes, así como la regulación, la actividad y la función de las proteínas, pueden ser modificadas. Debido a la reversibilidad del proceso epigenético y a que las proteínas son esenciales en este proceso, las proteínas constituyen blancos potenciales en las intervenciones farmacológicas y de prevención²⁸⁹.

Persuadidos de la influencia que ciertos fenómenos epigenéticos presentan en la génesis y evolución de la enfermedad aterosclerótica, nuestra aportación en la búsqueda de nuevos FRECV, favorece el avance del conocimiento, en la medida que pretende esclarecer la causalidad de la Hcy como FR modificable en la ATS, contribuyendo así a mejorar nuestra comprensión sobre el desarrollo de la placa ateromatosa en la práctica clínica. Consideramos que en este aspecto se circunscribe nuestro trabajo y su relevancia traslacional.

El empleo de la AMI constituye un reconocido y acreditado indicador de calidad en la CRC⁴³⁵⁻⁴³⁷. El registro nacional del corazón (*National Cardiac Database*, NCD) de la STS⁸, refleja que los cirujanos emplean al menos una AMI en ~92.4% de los enfermos, mientras que utilizan BIMA, exclusivamente en el 4% de los pacientes en la CRC, siendo esta tendencia creciente en el tiempo. Con todo ello, un número considerable de pacientes con EC aún no se benefician de los injertos de AMI en la CRC, pese a la contundencia de la evidencia. Existe certeza adicional respecto de la infrautilización de la AMI (en la CRC) en el género femenino, en los pacientes de raza negra y en los pacientes de la tercera edad, si bien no existe evidencia científica alguna que condicione el menoscabo para que se

favorezcan de la AMI en la CRC; y/o que se aluda en la literatura y/o en la práctica clínica y/o quirúrgica, a mayor incidencia de complicaciones como consecuencia del empleo de la AMI en la CRC en estos subgrupos poblacionales.

Derivado de nuestro presente trabajo, conceptuamos que la mayor plasticidad homeostática de la AMI, modulada a través de la metilación celular tejido-específica (regulada por mecanismos epigenéticos), además de representar un hallazgo novedoso en la comprensión de su resistencia innata a la aterogénesis, constituye a su vez una aportación traslacional que consolida el alcance de la AMI como injerto vascular autólogo en los pacientes con EC candidatos a CRC⁹⁻¹¹ (Tabla 16). En este aspecto, nuestro planteamiento frente al acicate en el empleo de la AMI durante la CRC es contundente y coincidente con el de la comunidad científica internacional⁴³⁵⁻⁴³⁷.



LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El actual trabajo presenta ciertas limitaciones. En primer término, el tamaño de la muestra obtenido resultó ser inferior al esperado. Brevemente, afirmar que en el diseño del estudio y el tamaño muestral, establecimos como exigencia la cumplimentación del consentimiento informado específico, a más de satisfacer una serie de criterios de inclusión, entre los que destacamos singularmente como requisito *sine qua non*, aquellos pacientes en quienes se empleó la AMI (al menos una AMI) y no otro injerto, en la cirugía de revascularización coronaria. A dicha acotación, que por ende significó excluir pacientes del estudio, se añadió la restricción propia de la logística que conlleva la obtención de dichos fragmentos, como: la coordinación entre el personal, las condiciones de conservación de las muestras y del traslado de las mismas, además de la idoneidad del fragmento obtenido, entre otros factores. Como consecuencia, un número significativo de pacientes se excluyó finalmente del estudio.

Señalar adicionalmente que sobre una misma muestra se realizaron diversas determinaciones. Por consiguiente, se requería una cantidad suficiente de tejido que permitiese la extracción de DNA, RNA y proteínas totales. Esto no siempre fue posible, lo que se tradujo en que en ocasiones no logramos obtener correlación entre las variantes polimórficas analizadas y los fenotipos evaluados. Particularmente y como señalamos en la discusión, la ausencia de N-homocisteinilación observada, pudiera deberse entre otras causas, a este hecho. De forma similar, la comparación a pares entre los territorios arteriales (AMI vs aorta) se realizó en un pequeño número de pacientes en los que obtuvimos simultáneamente fragmentos de AMI y aorta (punches aórticos). Concretamente, la determinación y análisis de los punches aórticos no siempre fue posible por las características propias del fragmento.



CONCLUSIONES

La unión de la homocisteína (Hcy) a las proteínas de la pared vascular ejerce un efecto deletéreo que difiere en su capacidad lesiva, dependiendo del tipo de enlace (amino o disulfuro) que se establezca.

- 1. En fragmentos de AMI provenientes de pacientes intervenidos de CRC detectamos pequeñas cantidades de Hcy unida a proteínas mediante puentes disulfuro (S-Hcy-p), lo que sugiere una mayor capacidad defensiva de la AMI (frente a otros tipos arteriales) ante concentraciones elevadas de Hcy.
- 2. En consonancia con la afirmación precedente, la ausencia de N-Hcy-p en la AMI pudiera justificarse por su mayor plasticidad homeostática.
- 3. Las variantes rs1801133 del gen MTHFR y rs854560 del gen PON1 afectan funcionalmente a sus genes respectivos. Observamos que la concentración de S-Hcy-p se asoció con los genotipos de riesgo de ambas variantes. Evidenciamos además una gradación por genotipos de acuerdo a la concentración media de S-Hcy-p. De acuerdo con ambas observaciones cabría concluir que los genotipos de riesgo se asocian con una mayor probabilidad de unión de la Hcy a las proteínas de la pared vascular.
- 4. En este trabajo se observó *in vivo* que la concentración de S-Hcy-p, pero no la de tHcy, se correlacionó con el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 en los fragmentos aórticos, pero no en los fragmentos de AMI. Sin embargo, el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 no parece contribuir significativamente a las variaciones en la expresión del gen DDAH2.
- 5. La evaluación conjunta de la expresión génica, el grado de metilación del gen promotor del DDAH2 y los metabolitos analizados, sugiere la independencia de las

modificaciones por metilación inducidas por la Hcy a concentraciones fisiológicas, en la vía de la señalización DDAH2/ADMA/eNOS/NO^{*}.



CONCLUSIONS

- 1. In internal mammary artery (IMA) short fragments collected from men and women undergoing coronary artery bypass surgery (CABG), we have found a small rate of Hcy-S incorporated proteins (Hcy-S-p) levels. It suggests an IMA strong capacity among atherosclerosis in hyperhomocysteinemia conditions.
- 2. In accord to the precedent paragraph, the IMA N-homocysteinylation absence reveal a more precise regulation of the homeostatic process. However, it might be related to an increased IMA homeostatic plasticity which also helps to block Hcy-S-p binding.
- 3. The Pon1 Leu55Met (rs 1801133) and MTHFR 677T (rs854960) gene polymorphisms seems contribute to the vascular wall Hcy-S-p binding properties. Moreover, comparison between territories led as to conclude that C677T variant associates with tissue-specific methylation modifications.
- 4. We found (*in vivo*) a correlation between methylation rates at the DDAH2 gene promoter and the Hcy-S-p levels (rather than tHcy) in punch aortic fragments, but not in IMA fragments. However, DDAH2 methylation patterns were unrelated to DDAH2 relative gene expression values in the analyzed territories.
- 5. Gene expression, DDAH2 gene promoter methylation degree and assessed metabolites suggest a mechanism that links physiological Hcy concentrations with promoter DDAH2 methylation modification and eNOS expression variations that seem to be independent to the DDAH2/ADMA/eNOS/ NO signalling pathway.



APORTACIONES ORIGINALES

Describimos por primera vez, la relación entre la S-Hcy-p y el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 *in vivo*, a concentraciones fisiológicas de Hcy. Esta correlación había sido reportada previamente exclusivamente *in vitro*. Igualmente, aludimos como resultado de nuestro estudio, que la mayor plasticidad homeostática de la AMI a través de la expresión génica diferenciada mediada por mecanismos epigenéticos (metilación celular tejido-específica), contribuye decisivamente a explicar la resistencia de la AMI a la aterogénesis.

Al margen de dichas aportaciones, consideramos pertinente mencionar posibles campos de investigación relacionados:

- 1. Profundizar en los mecanismos biológicos que subyacen a la labilidad vascular y a los factores implicados en la protección de los vasos sanguíneos frente a la ATS, especialmente de aquellas circunstancias que justifican la resistencia intrínseca de la AMI a la aterogénesis.
 - 2. Ahondar en el estudio de los FRECV, más allá de los FR clásicos.
- 3. Trasladar los conocimientos de la investigación fundamental (ciencias básicas) a la práctica clínica diaria, mediante la investigación cardiovascular "traslacional" real y efectiva.
- 4. Sugerir nuevas vías de estudio que contribuyan a la evidencia científica de la ATS y la EC.



FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Consideramos perentorio avanzar en el aprendizaje de los siguientes ítems, entre otros:

- 1. Mecanismos moleculares que involucran la Hcy como FR en las ECV de origen aterosclerótico.
- 2. Estudios clínicos prospectivos randomizados y de asociación de genómica que establezcan la relación de causalidad entre la Hcy y la ATS, al demostrar que la reducción de Hcy, disminuye a su vez el riesgo cardiovascular.
 - 3. Otros mecanismos mediante los cuales la HHcy altera el endotelio vascular.
- 4. Evaluar si los productos metabólicos derivados de la oxidación de la Hcy, entre ellos la Hcy-TL, son mejores indicadores del riesgo cardiovascular que la tHcy *per se*.
- 5. Profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la interrelación HDL-PON que permitan vislumbrar nuevas estrategias en la prevención y tratamiento de las ECV.
- 6. Inquirir sobre los determinantes genéticos y no genéticos de la actividad PON que contribuyan a explicar las diferencias individuales observadas en el *status* de la enzima PON1.
- 7. Efectuar estudios prospectivos amplios que ayuden a determinar la inconsistencia entre los polimorfismos de la región del promotor del gen PON1 y la EC.
- 8. Elaborar estudios de los polimorfismos de los genes PON con mayor participación de mujeres en la cohorte objeto del estudio para evaluar su diferencia por género y su relación con la EC.
- 9. Efectuar trabajos que evalúen la correlación entre los polimorfismos de los genes PON2, PON3 y la EC.

- 10. Interacción ADMA-NO' en los vasos sanguíneos y su relevancia como marcador del riesgo cardiovascular.
- 11. Estudio de las vías epigenéticas implicadas en la génesis de las ECV ateroscleróticas, verbigracia la EC.
- 12. Desentrañamiento del epigenoma en la célula aterosclerótica, en el endotelio vascular distorsionado por la placa de ateroma y en los epigenomas de las diferentes líneas celulares que conforman la red de los vasos sanguíneos del organismo.
- 13. Desenmascaramiento de los componentes en el adecuado engranaje del puzle Hcy-SAH-metilación-ATS.
 - 14. Comprensión de la HHcy y sus implicaciones en la vía DDAH/ADMA/NOS/ NO.
- 15. Umbral mínimo de Hcy proaterogénica que permita seleccionar más adecuadamente los individuos que se benefician del aporte exógeno de folatos y de vitaminas del complejo B.
- 16. Determinar las indicaciones del aporte de folatos en los individuos con HHcy leve/moderada, así como del beneficio de dicha pauta en la prevención primaria y secundaria de las ECV en personas con Hcy plasmática en rango fisiológico.
- 17. Efectuar estudios que aporten resultados más categóricos, al evaluar la intervención del aporte de folatos sobre la concentración de Hcy, así como de su repercusión en la prevalencia de las ECV.
- 18. Estudios de intervención sobre la Hcy en el desarrollo de eventos vasculares en pacientes con IRC y alteración moderada del aclaramiento de creatinina.
 - 19. Factores que regulan la síntesis de Hcy-T y su reactividad hacia las proteínas.
- 20. Relación entre la concentración de Hcy-T y las N-Hcy-p en condiciones patológicas.
 - 21. Actividad HTasa de las enzimas PON2 y PON3.
 - 22. Proceso intracelular de N-Hcy-p *in vivo* en los humanos.



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A Adenosina

ABCG-1 Receptor ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
Receptor ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 4

ACC American College of Cardiology
ACQA Ambulatory Care Quality Alliance

ACTP Angioplastia coronaria transluminal percutánea

ACV Accidente cerebrovascular

A Adenosina

AA Aorta ascendente

ADMA Dimetilarginina asimétrica
ADA Arteria descendente anterior
AHA American Heart Association

AHEAD Alliance for the Human Epigenome and Disease

Ala Alanina

AMI Arteria mamaria interna

ANG II Angiotensina II
ApoA-I Apolipoproteína A-I
ApoA-II Apolipoproteína A-II
apoB Apolipoproteína B
apoE Apolipoproteína E
apoE-/- knockout para apoE

apoE/PON1-/- knockout para apoE/paraoxonasa 1

Arg Arginina

ATB Aterotrombosis
ATP Adenosintrifosfato

AT1-R Receptor tipo 1 de la angiotensina II

ATS Aterosclerosis

BCP Bypass cardiopulmonar

BH₂ Peroxinitrito

BH₄ Tetrahidrobiopterina bHcy Hcy unida a proteínas

BIMA Arteria mamaria interna bilateral (bilateral internal mammary artery)

BHMT Betaína homocisteína metiltransferasa

BLH Bleomicina hidrolasa

C Citosina

CAC Calcificación de las arterias coronarias

CAMs Moléculas de adhesión celular CAM-1 Molécula de adhesión celular 1

CAT Aminoácidos catiónicos CBS Cistationa β sintasa

CCN Células de la cresta neural

CCS Canadian Cardiovascular Society

cDNA DNA complementario
CE Células endoteliales

CEC Circulación extracorpórea

CEOH Hidróxidos de ésteres de colesterol CEOOH Ésteres de colesterol peroxidados

CETP Proteína de transferencia de ésteres de colesterol

CH₃ Grupo metil

CNIC Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
CpG Nucleótidos pareados de citosina y quanina del genoma

CRC Cirugía de revascularización coronaria

Cys Cisteína

DDAH Dimetilarginina dimetilaminohidrolasas
DDAH1 Dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1
DDAH2 Dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2

DLP Dislipemia

DM Diabetes mellitus

DMR Dominios de cromatina con metilación diferenciada

DNA Ácido desoxirribonucleico
DNMT Metiltransferasas del DNA
DNMT1 Metiltransferasa del DNA 1
DNMT3A Metiltransferasa del DNA 3A
DNMT3B Metiltransferasa del DNA 3B

DOHaD Developmental Origins of Health and Disease

dsRNA double-stranded RNA

DTT Ditiotreitol DTT DKO Doble knockout

EBCT Electrom beam computed tomography.

EC Enfermedad coronaria

ECV Enfermedades cardiovasculares de origen aterosclerótico

EDRF Endothelium-derived relaxing factor

EDRF/NO Respuesta vasodilatadora del endotelio mediada por óxido nítrico

EGF Epidermal growth factor

EHHC European Heart Health Charter

eNOS-/- knockout para la sintasa del óxido nítrico endotelial

eNOS (NOS-III) Sintasa del óxido nítrico endotelial

ERα Receptor α de estrógenos ERβ Receptor β de estrógenos

E-selectina Selectina de expresión endotelial

ET-1 Endotelina 1

EWAS Epigenome-wide association studies

FAMILY Family Atherosclerosis Monitoring In earLY life

FDA Food and Drug Administration

FEVI Fracción de eyección del ventrículo izquierdo FGF- β Factor de crecimiento de los fibroblastos β Homocisteína libre (no unida a proteínas)

FHS Framingham Heart Study
FR Factor (es) de riesgo

FRECV FR para el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares

G Guanina

GIMc Grosor de las capas media e íntima de la arteria carótida

Gln Glutamina

GM-CSF Factor estimulante de la formación de colonias de los granulocitos

GPIIb/IIIa Receptor para la glucoproteína GPIIb/IIIa

GWAS Genome-wide association studies
H1 Histona 1 o histona de unión

H4 Histona H4 H2A Histona H2A

H₂O₂ Peróxido de hidrógeno

HAT Acetiltransferasas de histonas

H2B Histona H2B Hcy Homocisteína

Hcy-p Homocisteína unida a proteínas/proteína homocisteinilada

Hcy-S-S-Cys Homocisteinil cisteína

Hcy-S-S-Hcy Homocistina

Hcy-T Homocisteína tiolactona HDAC Deacetilasas de histonas

HDACi Inhibidores de las deacetilasas de histonas

HDL Lipoproteínas de alta densidad

HHcy Hiperhomocisteinemia

Hinfl Enzima de restricción Haemophilus influenzae I

HMT Metiltransferasas de histonas

HPLC High Performance Liquid Chromatography

HTA Hipertensión arterial

HTasa Homocisteína tiolactonasa

H3K4me2 Histona H3K4me2 H3K4me3 Histona H3K4me3

IAM Infarto agudo de miocardio

ICAM-1 Moléculas de adhesión intercelular 1 ICAM-2 Moléculas de adhesión intercelular 2 IGF-1 Factor de crecimiento tipo insulina 1

 $\begin{array}{lll} \text{IL-1} & \text{Citocina/interleucina IL-1} \\ \text{IL-1}\beta & \text{Citocina/interleucina 1}\beta \\ \text{IL-4} & \text{Citocina/interleucina IL-4} \\ \text{IL-8} & \text{Citocina/interleucina IL-8} \\ \text{IMC} & \text{Indice de masa corporal} \\ \end{array}$

INE Instituto Nacional de Estadística

INF-y Interferón y

iNOS (NOS-II) Sintasa inducible del óxido nítrico

INTERHEART Global case-control study of risk factors for acute myocardial infarction

IRC Insuficiencia renal crónica

iRNA Ácido ribonucléico de interferencia o siRNA (small interfering RNA)

K-HMT Metiltransferasa de histona K

KO Knockout

LAF-1 Integrina leucocitaria (*lymphocyte function-associated antigen* 1)

LCAT Transferasa de grupos acilo desde lecitina a colesterol

LDL Lipoproteínas de baia densidad

LDLm LDL modificadas

LDLmox LDL mínimamente oxidadas

LDLox LDL oxidadas

LDLR Receptor para las LDL nativas

Leu Leucina

Lip-a Lipoproteína-a 15-LO 15-lipooxigenasa

LOI Pérdida de la impronta genómica (imprinting)

LOX-1 lectin like oxidized LDL receptor-1

LPS Lipopolisacaridos

L-NAME NG-nitro-L-arginine methyl ester

L-NMA. *NG-methyl-L-arginine*

L-selectina. Selectina de expresión leucocitaria

Lys Lisina

MBD Methyl binding domain MC Células mieloides

MCP-1 Sustancia quimiotáctica plaquetaria 1

MEC Matriz extracelular

Met Metionina

MetRS Aminoacil-tRNA sintasas

miRNAs MicroRNAs mRNA RNA mensajero MS Metionina sintasa

MSR Metionina sintasa reductasa 5-MTHF. 5.10-metiltetrahidrofolato

MTHFR Enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa

NF-kB Factor de transcripción nuclear kappa B

 NH_2 Grupo amino α Grupos amino α ε-NH2 Grupos amino α Grupos amino épsilon

N-Hcy N homocisteína (Hcy unida mediante enlaces amida)

N-Hcy-p N-Hcy unida a proteínas (N-homocisteinilización de las proteínas)

NIH National Institutes of Health

nNOS (NOS-I) NOS neuronal

nMSP nested Methylation Specific PCR analysis

NO Óxido nítrico

NOS Sintasas del óxido nítrico
NQF National Quality Forum
NYHA New York Heart Association

OP Organofosforados

OPCABG Off pump coronary artery bypass grafting p53 Fosfoproteína 53 o tumor proteína 53 PAF Factor activador de las plaquetas

PAF-AH Acetilhidrolasa del factor activador de las plaquetas

PAI-1 Inhibidor del activador del plasminógeno tisular 1

PCI Percutaneus coronary intervention

PCR Polymerase Chain Reaction

PDGF Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PECAM-1 Molécula de adhesión plaquetaria 1

piRNAs *Piwi-interacting* RNAs PKC Proteína cinasa C

P-selectina Selectina de expresión plaquetaria

PON Paraoxonasas PON1 Paraoxonasa 1

PON1 -/- Knockout para PON1

PON2 Paraoxonasa 2 PON3 Paraoxonasa 3

PRMT (R-HMT) Metiltransferasas de arginina o protein arginine N-methyltransferases

PURE Prospective Urban Rural Epidemiology

R Arginina

RC Revascularización coronaria
RE Retículo endoplásmico

RFLP Restriction fragment length polymorphysm

Rho The Ras homolog gene family

RhoA The Ras homolog gene family member A

R-HMT (PRMT) Metiltransferasas de histona-R o metiltransferasas de arginina

RNA Ácido ribonucléico RNAs Small non-coding RNAs

RNS Especies reactivas derivadas del nitrógeno

ROS Especies reactivas de oxígeno

RP-HPLC HPLC (High Performance Liquid Chromatography) de fase reversa

rs662 Variante (polimorfismo) Gln192Arg PON1 rs7493 Variante (polimorfismo) Ser311Ser PON2 rs854560 Variante (polimorfismo) Met55Leu PON1

rs1801133 Variante (polimorfismo) Ala222Val MTHFR (C677T MTHFR)

SAM S-adenosil-metionina SAH S-adenosil-homocisteína

SAHh S-adenosil-homocisteína hidrolasa

SCA Síndrome coronario agudo

SCAR-BI Receptor scavenger clase B tipo 1

Ser Serina

SH Grupo sulfhidrilo, tiol o *thiol*

S-Hcy S-homocisteína (Hcy unida mediante enlaces disulfuro)

S-Hcy-p S-Hcy unida a proteínas (S-homocisteinilización de las proteínas)

siRNA o iRNA small interfering RNA o interfering RNA

S-nitroso-Hcy S-nitroso-homocisteína

SNPs Single nucleotide polymorphisms
STS Society of Thoracic Surgeons

T Timina

TD-PCR Touchdown PCR (Polymerase Chain Reaction)

TGF- β Factor de crecimiento transformante β

Abreviaturas y acrónimos

tHcy Hcy plasmática total THF Tetrahidrofolato

TNF-α Factor de necrosis tumoral α t-PA Activador del plasminógeno tisular

TPP Trifenilfosfina

TRC Transporte inverso de colesterol

tRNA RNA de transferencia

UE Unión Europea

UPR Unfolded protein response

Val Valina

VCAM-1 Moléculas de adhesión de las células vasculares 1
VEGF Factor de crecimiento del endotelio vascular
VLA-4 Very Late Antigen-Integrin alpha 4 beta 1

VSMC Células musculares lisas de los vasos sanguíneos

WHO World Health Organization



FIGURAS

1	Escenario aterosclerótico	23
2	Morbilidad y mortalidad atribuible a las enfermedades cardiovasculares	24
3	Proyecciones de población 2012-2052 para España	27
4	Aterosclerosis coronaria	28
5	Manifestaciones de la aterotrombosis	29
6	Formación de la estría grasa	33
7	Identificación de macrófagos mediante tinción inmunológica en muestras de	
	aterectomía coronaria	34
8	Micro-CT de una placa coronaria y los vasa vasorum	36
9	Placa coronaria vulnerable	37
10	Homocisteína y estrés oxidativo	41
11	Anatomía microscópica de los vasos sanguíneos	42
12	Histopatología coronaria y aterotrombosis	44
13	Disfunción endotelial	45
14	Lesión aterosclerótica avanzada	46
15	Placa fibrosa inestable	47
16	Óxido Nítrico	59
17	Óxido nítrico y sepsis	61
18	Células mieloides y arginina	62
19	Óxido nítrico endotelial	63
20	Marcadores del riesgo cardiovascular	71
21	Conocimiento actual de la aterosclerosis	74
22	Homocisteína y aterosclerosis	76
23	Homocisteína y enfermedades cardiovasculares	77
24	Estructura química de los aminoácidos azufrados	79
25	Ciclo metabólico de la homocisteína	82
26	Conversión metabólica de metionina a homocisteína	86
27	Scan GWAS de la homocisteína	90
28	Homocisteína, folatos y ADMA	98
29	Homocisteína, folatos y aterosclerosis	101
30	Auto-oxidación de la homocisteína	104
31	Incorporación de homocisteína a las proteínas	107
32	Formación de homocisteína tiolactona	108
33	Hipótesis fisiopatológica de la enfermedad vascular mediada por la	
	homocisteína tiolactona	109
34	Homocisteinilización de las proteínas	110
35	Estructura de las proteínas S/N homocisteiniladas	111
36	Estructura tridimensional de la enzima paraoxonasa 1	116
37	Metabolismo de las HDL, función protectora frente a la oxidación de las LDL e	_
	interrelación con la enzima PON1	123
38	Determinantes de la regulación transcripcional del gen PON1	125
39	Fórmulas químicas de la arginina y la dimetilarginina asimétrica	131

40	ADMA, especies reactivas de oxígeno y su relación con los factores de riesgo cardiovascular	133
41	Formación y actividad de la ADMA en el interior de la célula	135
42	DDAH, homeostasia cardiovascular y renal	138
43	Células madre	142
44	Modificaciones químicas del material genético	143
45	Deacetilasas de histonas y sirtuinas	145
46	Cartografía del genoma mediante la técnica del bisulfito	147
47	Epigenética y medio ambiente	148
48	Impacto epigenético sobre el control génico	149
49	Modelo epigenético	150
50	Cartografía cromosómica en gemelos monocigotos	152
51	Representación de la cromatina y expresión génica	155
52	Subunidad de Histonas	157
53	El nucleosoma	159
54	Genoma, epigenoma y evolución de la información genética en el tiempo	165
55	Mecanismos epigenéticos y enfermedades complejas	166
56	Epigénesis, aterosclerosis y la pared de los vasos sanguíneos	172
57	Anatomía de la arteria mamaria interna	177
58	Angiografía de la arteria mamaria interna	178
59	Vasilii Ivanovich Kolesov	180
60	René Gerónimo Favaloro y Donald Brian Effler	181
61	Cirugía de revascularización coronaria	184
62	Arteria mamaria interna izquierda <i>in situ</i>	197
63	Arteria mamaria interna "esqueletizada"	198
64	Anatomía del corazón, aorta ascendente y arteria mamaria interna	199
65	Hospital Universitario de Gran Canaria "Dr. Negrín"	201
66 67	Descripción del tamaño muestral: diagrama de flujo	202 203
67 68	Homogeneizado vascular de arteria mamaria interna y genotipado Reacción en cadena de la polimerasa	203
69	Autoclave <i>P-selecta Auster-M</i> . Equipo para producir agua destilada. Centrífuga	204
70	Cromatógrafo <i>VARIAN</i> PS230	212
71	Valoración de las proteínas homocisteiniladas	214
72	Lector de absorbancia ELISA EL _x 800	215
73	Genotipo C677T MTHFR/Ala222Val [rs 1801133] y concentración media de	210
	homocisteína	224
74	Genotipo Gln192Arg [rs 662] del gen PON1 y concentración media de homocisteína	225
75	Genotipo Met55Leu [rs 854560] del gen PON1 y concentración media de	
	homocisteína	225
76	Genotipo Cys311Ser [rs 7493] del gen PON2 y concentración media de homocisteína	226
77	Análisis de la homocisteína unida a proteínas en la arteria mamaria interna	227
78	Expresión de S-homocisteína en la arteria mamaria interna y su relación con el	
	genotipo. Modelo del logaritmo aditivo	230
79	Relación entre la concentración de S-homocisteína en la arteria mamaria	000
00	interna y los genotipos de riesgo. Gráfica de la media ± la desviación típica	232
ጸበ	Expresión del gen eNOS en la arteria mamaria interna y la aorta	234

Relevancia de polimorfismos génicos y la S-homocisteína en la epigénesis en arteria mamaria interna y aorta		
81	Expresión del gen iNOS en la arteria mamaria interna y la aorta	235
82	Expresión del gen DDAH2 en la arteria mamaria interna y la aorta	235
83	Evaluación del grado de metilación de las islas CpG del promotor del gen DDAH2 mediante nMSP	236
84	Metilación de las islas CpG del promotor del gen DDAH2 en la arteria mamaria y la aorta	237
85	Correlación significativa entre la S-Hcy-p y el grado de metilación del promotor	
	del gen DDAH2 en los <i>punches</i> aórticos	238
86	Investigación cardiovascular "traslacional"	254



TABLAS

	· 	
1.	Efectos biológicos del óxido nítrico	64
2.	Factores de riesgo cardiovascular	66
3.	"Declaración de Luxemburgo" sobre el estilo de vida para alcanzar la salud	_,
	cardiovascular	74
4.	Guías europeas de la práctica clínica sobre la prevención de las enfermedades	
_	cardiovasculares	75
5.	Causas más habituales de la deficiencia de folatos	92
6.	Entidades que cursan con incremento de homocisteína	94
7.	Medicamentos que incrementan la homocisteína	94
8.	Mecanismos que relacionan la hiperhomocisteinemia y la trombosis	100
9.	PON1 humana y su relación con las enfermedades cardiovasculares	120
10.	Factores que determinan la expresión de la enzima paraoxonasa 1	124
11.	Entidades y factores del riesgo cardiovascular relacionados con incremento de ADMA	132
12.	Factores que regulan la expresión del gen DDAH2	136
13.	Enfermedades asociadas a pérdida de la impronta genómica	167
14.	Genes involucrados en la aterosclerosis y regulados por mecanismos epigenéticos	171
15.	Explicaciones propuestas a la resistencia de la arteria mamaria interna a la aterosclerosis	179
16.	Principales momentos históricos de la cirugía de revascularización coronaria	180
17.	Indicaciones y criterios de aceptabilidad en la revascularización coronaria	185
18.	Indicaciones de la cirugía de revascularización coronaria sin circulación	
40	extracorpórea	196
19.	Secuencia de <i>primers</i> y condiciones de la reacción de la nMSP	207
20.	Características de la población. Variables cualitativas	221
21.	Características de la población. Variables cuantitativas	222
22.	Genotipo C677T MTHFR/Ala222Val (rs 1801133) y concentración media de homocisteína	223
23.	Genotipo Gln192Arg PON1 (rs 662) y concentración media de homocisteína	224
24.	Genotipo Met55Leu PON1 (rs 854560) y concentración media de homocisteína	224
25.	Genotipo Cys311Ser (rs 7493) del gen PON2 y concentración media de homocisteína	226
26.	Concentración de S-homocisteína en la arteria mamaria interna y su distribución por genotipos	229
27.	Expresión de S-homocisteína en la arteria mamaria interna y su relación con	
	los genotipos. Modelo del logaritmo aditivo	230
28.	Expresión de los genes eNOS, iNOS y DDAH2, según el genotipo y el territorio arterial evaluado	233
29.	Correlación entre tHcy, S-Hcy y metilación del promotor del gen DDAH2 en la arteria mamaria interna y la aorta	237

30. Correlación entre el grado de metilación del promotor del gen DDAH2 y la expresión de los genes DDAH2, eNOS e iNOS, en la arteria mamaria interna y la aorta 239



PUBLICACIONES



1. Rodríguez F, Serna J, Hernández E, Estupiñán L, Hernández Y, Buset N, Rodríguez JC. Relevancia de la S-homocisteína en arteria mamaria interna. Correlación con los genotipos MTHFR (C677T) y genotipos Paraoxonasa 1-tiolactona hidrolasa Gln192Arg, Met55Leu y Paraoxonasa 2- Cys311Ser. Unidad de Investigación. Hospital Universitario de Gran Canaria "Dr. Negrín". Trabajo presentado en la 15ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión, Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA). Marzo 9-12 de 2010. Zaragoza, España.

Prevención Integral Vascular del Riesgo Vascular

Introducción

En la cirugía de revascularización coronaria es habitual la elección de la arteria mamaria interna (AMI) frente a otras alternativas (injertos), debido a su mayor resistencia al desarrollo de aterosclerosis. Se ha sugerido que a esta resistencia contribuye entre otras variantes: 1. La mayor capacidad funcional del endotelio de la AMI, a través de su mayor producción de NO⁻. 2. Disminución en la expresión de genes protrombóticos. 3. Disminución de la actividad de la ruta de la señalización RhoA/ROK.

La mayor parte de la homocisteína (Hcy) se encuentra en el plasma ligada a la albumina. La unión de la Hcy a proteínas u homocisteinilación se produce a través de dos mecanismos principales: la N-homocisteinilación y la S-homocisteinilación. Cada vez

adquiere mayor importancia médica la determinación de proteínas homocisteiniladas en diversos territorios y en pacientes concretos.

Las variantes paraoxonasa 1 (Gln192Arg y Met55Leu) y paraoxonasa 2 (Cys311Ser) influencian la concentración de Hcy a través de su capacidad tiolactona hidrolasa. La variante C677T en el gen MTHFR se asocia con concentraciones elevadas de homocisteína (moderada e intermedia).

Objetivos

Determinar la concentración de homocisteína unida a proteínas (S-homocisteinilación) en fragmentos de AMI y su relación con los genotipos MTHFR (C677T), PON1 (Gln 192Arg) y PON2 (Cys311Ser).

Métodos

Se obtuvieron fragmentos de AMI descartados durante la cirugía de revascularización en 192 pacientes. Para la determinación de S-homocisteína se obtuvieron homogeneizados que fueron analizados por cromatografía HPLC y detección por espectrofluometría. El mismo homogeneizado se utilizó para la cuantificación proteica y para la extracción de DNA y determinación de los fenotipos MTHFR C677T, PON1 Gln 192Arg y Met55Leu y PON2 Cys311Ser.

Resultados

Del total de 192 pacientes analizados se obtuvo S-homocisteína (S-Hcy) en 66 fragmentos de AMI (34.375%). No se halló correlación estadística entre los niveles de S-Hcy unida a proteína en fragmentos AMI y los genotipos PON1 Gln 192Arg y PON2 Cys311Ser; únicamente los genotipos MTHFR C677T y PON1 Met55Leu correlacionan con los niveles de S-Hcy (p = 0.005 y p = 0.038 respectivamente).

Conclusiones

Aún está por establecer la relevancia *in vivo* de la modificación por unión reversible de la homocisteína a proteínas vasculares. Nuestros resultados, preliminares, sugieren sin

Relevancia de polimorfismos génicos y la S-homocisteína en la epigénesis en arteria mamaria interna y aorta embargo, la relevancia de la concentración de HDL (estrechamente vinculada a los genotipos PON1 Met55Leu) y de marcadores clásicos (genotipos C677T del gen MTHFR) en la dinámica de esta unión en los fragmentos de AMI.

Relevancia de la S-homocisteína en arteria mamaria interna. Correlación con los genotipos MTHFR (C677T) y genotipos Paraoxonasa 1-tiolactona hidrolasa Gln192Arg, Met55Leu y Paraoxanasa 2-Cys311Ser.

Rodríguez Esparrayón, Francisco; Sema Gómez, Jaime; Hemández Velázquez, Érika; Estupiñán Quintana Lidia; Hemández Trujilio Yaridé; Buset Ríos, Nisa; Rodríguez Pérez, Carlos Un idad de Investigación, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr., Negrín

Introducción

En la cirugía de revascularización coronaria es habitual la elección de la arteria mamaria interna (AMI) frente a otras debido a su mayor resistencia al desarrollo de aterosclerosis. Se ha sugerido que a esta resistencia contribuye entre otras variantes, una mayor capacidad funcional del endotelio AMI a través de una mayor producción de NO, diferencias significativas por disminución en la expresión de genes protrombóticos o a la disminución de la actividad de la ruta de señalización RhoA/ROK.

La mayor parte de la homocisteína (Hcy) se encuentra en el plasma ligada a la albúmina. La unión de la Hcy a proteínas u homocisteinilación se produce a través de dos mecanismos principales: la N-homocisteinilación y la S-homocisteinilación. Cada vez adquiere mayor importancia médica la determinación de proteínas homocisteiniladas en diversos territorios y en pacientes concretos.

Las variantes paraoxonasa 1 (Gln192Arg) y (Met55Leu) y paraoxonasa 2 (Cys311Ser) influencian la concentración de Hcy a través de su capacidad tiolactona hidrolasa. La variante C677T en el gen MTHFR se asocia con concentraciones elevadas de homocisteína (moderadas e intermedias)



Obietivos

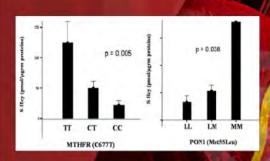
Determinar la concentración de homocisteína unida a proteínas (S-homocisteinilación) en fragmentos de AMI y su relación con los genotipos MTHFR (C677T), PON1 (Gln192Arg) y (Met55Leu) y PON2 (Cys311Ser).

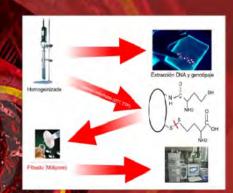
Métodos

Se obtuvieron fragmentos de AMI descartados durante la cirugía de revascularización en 192 pacientes. Para la determinación de S-homocisteína se obtuvieron homogeneizados que fueron analizados por cromatografía HPLC y detección por espectrofluorimetría. El mismo homogeneizado se utilizó para la cuantificación proteica y para la extracción de ADN y determinación de los genotipos MTHFR C677T, PON1 Gln192Arg y Met55Leu y PON2 Cys311Ser.

Resultados

Del total de 192 pacientes analizados se obtuvo S-homocisteina (S-Hcy) en 66 fragmentos AMI (34.375%). No se halló correlación estadística entre los niveles de S-Hcy unida a proteína en fragmentos AMI y los genotipos PON1 Gln192Arg y PON2 Cys311Ser; únicamente los genotipos MTHFR C677T y PON1 Met55Leu correlacionan con los niveles de S-Hcy (p = 0.005 y p = 0.038 respectivamente).





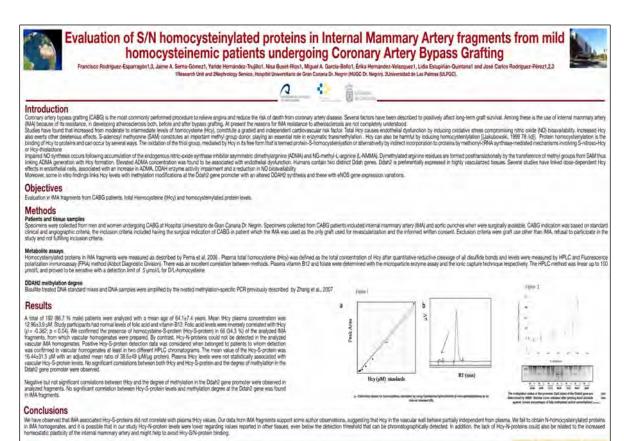
Conclusiones

Aún está por establecer la relevancia in vivo de la modificación por unión revérsible de la homocisteína a proteínas vasculares. Nuestros resultados, preliminares, sugieren sin embargo, la relevancia de la concentración de HDL (estrechamente vinculada a los genotipos PON1 Mei55Leu) y de marcadores clásicos (genotipos C677T del gen MTHFR) en la dinámica de esta unión en fragmentos de IMA.





2. Rodríguez-Esparragón, Francisco, Serna-Gómez, Jaime, Hernández-Trujillo, Yaride, Buset-Ríos, Nisa, Quintana, Lidia Rockfighaez-Pérez, José de Gran Canaria (HUGC) Dr. Negrin. Miguel, Estupiñán-José C. Research Unit. Hospital Universitario Las Palmas de Gran Canaria, Spain. Evaluation of S/N homocysteinylated proteins in internal mammary artery (IMA) fragments from mild homocysteinemic patients undergoing coronary artery bypass grafting. Trabajo presentado en el: Annual Scientific Meeting of the American Society of Hypertension (ASH) 2012, New York, New York, May 19-22, 2012 y publicado en el special issue: American Society of Hypertension, Inc. Twenty-Seventh Annual Scientific Meeting and Exposition. Journal of Clinical Hypertension. JCH. 2012;14 (Suppl 1):213.



Abstracts of the American Society of Hypertension, Inc.

Annual Scientific Meeting, New York, New York May 19 - 22, 2012

ASH Annual Scientific Meeting, Volume 14, May 2012 Abstract Supplement

The Journal of Clinical Hypertension New York, New York May 19-22, 2012.



Evaluation of S/N homocysteinylated proteins in internal mammary artery (IMA) fragments from mild homocysteinemic patients undergoing coronary artery bypass grafting

Rodríguez-Esparragón, *Francisco*, **Serna-Gómez, Jaime**, Hernández-Trujillo, Yaridé, Buset-Ríos, Nisa, García-Bello, Miguel, Estupiñán-Quintana, Lidia, Rodríguez-Pérez, José C.

Several factors affect long-term graft survival, after CABG among these, the use of IMA because of its resistance to atherosclerosis. Reasons for IMA resistance are not completely understood. We evaluated in IMA fragments from CABG patients, total Homocysteine (tHcy) and homocysteinylated protein levels. tHcy was measured by HPLC in plasma. Homocysteinylated proteins in IMA fragments were measured as has been described by Perna, et al (Kidney Int 2006; 69:869–876) with modifications.

RESULTS:

A total of 192 (86.7% male) patients were analyzed with a mean age of 64.1 ± 7.4 years, and normal levels of folic acid and vitamin B12. Mean plasma tHcy was 12.96 ± 3.9 mM. Folic acid levels were inversely correlated with tHcy (r = -0.362; p = 0.04). We confirmed the presence of homocysteine-S-protein (Hcy-S-protein) in 34.3% of the analyzed IMA fragments, from which vascular homogenates were prepared. By contrast, Hcy-N-proteins could not be detected in the analyzed vascular IMA homogenates. Positive

Hcy-S-protein detection data was considered when belonged to patients to whom detection was confirmed in vascular homogenates at least in two different HPLC chromatograms. The mean value of the Hcy-S-protein was 16.44 ± 31.5 mM with an adjusted mean ratio of 38.6 ± 49 (mM/mg protein). Plasma tHcy levels were not statistically associated with vascular Hcy-S-protein levels. No significant correlations between both tHcy and Hcy-S-protein and the degree of methylation in the Ddah2 gene promoter were observed.

CONCLUSIONS:

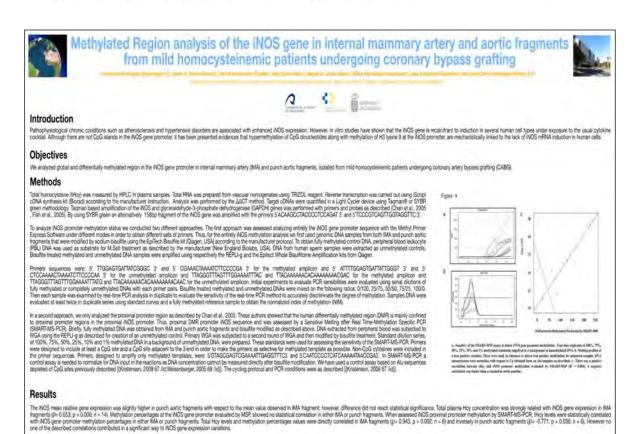
We have observed that IMA associated Hcy-S-proteins did not correlate with plasma tHcy values. Our data from IMA fragments suggested that Hcy in the vascular wall behave partially independent from plasma. We fail to obtain N-homocysteinylated proteins in IMA homogenates, and it is possible that in our study Hcy-N-protein levels were lower regarding values reported in other tissues, even below the detection threshold that can be chromatographically detected. In addition, the lack of Hcy-N-proteins could also be related to the increased homeostatic plasticity of the internal mammary artery and might help to avoid Hcy-S/N-protein binding.

KEYWORDS:

Homocysteinemia; Coronary Artery Disease; Internal Mammary Artery; Coronary Artery Bypass Grafting.

this To cite abstract. please the following information: use Rodríguez-Esparragón, *Francisco*, Serna-Gómez, Jaime, Hernández-Trujillo, Yaridé, Buset-Ríos, Nisa, García-Bello, Miguel, Estupiñán-Quintana, Lidia, et al; Evaluation of S/N homocysteinylated proteins in internal mammary artery (IMA) fragments from mild homocysteinemic patients undergoing coronary artery bypass grafting [abstract]. Journal of Clinical Hypertension 2012;14 Suppl 1:213.

3. Rodríguez-Esparragón, Francisco, Serna-Gómez, Jaime, Hernández-Trujillo, Yaride, Buset-Ríos, Nisa, García-Bello, Miguel, Hernández-Velázquez, Erika, Rodríguez-Pérez, José C. Research Unit. Hospital Universitario de Gran Canaria (HUGC) Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria, Spain. Methylated region analysis of the iNOS gene in internal mammary artery (IMA) and aortic fragments from mild homocysteinemic patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG). Trabajo presentado en el Annual Scientific Meeting of the American Society of Hypertension (ASH) 2012, New York, New York. May 19-22, 2012 y publicado en el special issue: American Society of Hypertension, Inc. Twenty-Seventh Annual Scientific Meeting and Exposition. Journal of Clinical Hypertension. JCH. 2012;14 (Suppl 1):213.



Our data, evaluating both distal and proximal INOS promoter regions argue in favor of the major relevance of other Hoy induced mechanisms acting on INOS gene expression variation, rather than, a direct effect of Hoy-induced CpG methylation on INOS gene expression.

Conclusions

Abstracts of the American Society of Hypertension, Inc.

Annual Scientific Meeting, New York, New York May 19 - 22, 2012

ASH Annual Scientific Meeting, Volume 14, May 2012 Abstract Supplement

The Journal of Clinical Hypertension New York, New York May 19-22, 2012.



Methylated region analysis of the iNOS gene in internal mammary artery (IMA) and aortic fragments from mild homocysteinemic patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG)

Rodríguez-Esparragón, *Francisco*, **Serna-Gómez, Jaime**, Hernández-Trujillo, Yaridé, Buset-Ríos, Nisa, García-Bello, Miguel, Hernández-Velázquez, Érika, Rodríguez-Pérez, José C.

Atherosclerosis is associated with enhanced iNOS expression. In vitro studies however, have shown that the iNOS gene is recalcitrant to induction in several human cell types under exposure to the usual cytokine cocktail. It has been presented evidences that hypermethylation of CpG dinucleotides along with methylation of H3 lysine 9 at the iNOS promoter, are mechanistically linked to the lack of iNOS mRNA induction in human cells.

RESULTS:

We analyzed global and differentially methylated region in the iNOS gene promoter in IMA and punch aortic fragments, isolated from mild homocysteinemic patients undergoing CABG.

Total homocysteine (tHcy) was measured by HPLC in plasma samples. Gobal methylation was assessed analyzing entirely the human iNOS gene promoter sequence and designing

methylation-specific PCR (MSP) method. Mean of MSP values were expressed as

Normalized Methylation Index (NIM). Also, we encompassing only proximal promoter iNOS

sequence and was assessed by developing a Sensitive Melting after Real Time-

Methylation Specific PCR (SMART-MS-PCR) assay, and values were expressed (%).

The iNOS mean gene expression was slightly higher in punch aortic fragments with respect

to the mean value observed in IMA fragment, without statistical significance. Total plasma

Hcy concentration was strongly related with iNOS gene expression in IMA fragments

(r=0.653; p=0.006; n=14). When assessed iNOS proximal promoter methylation by

SMART-MS-PCR, tHcy levels were statistically correlated with iNOS gene promoter

methylation percentages in either IMA or punch fragments. Total Hcy levels and

methylation percentages values were directly correlated in IMA fragments (r = 0.943;

p = 0.002; n = 6) and inversely in punch a ortic fragments (r = -0.771; p = 0.036; n = 6).

Neither of the described correlations contributed in a significant way to iNOS gene

expression variations.

CONCLUSIONS:

Our data, evaluating both distal and proximal iNOS promoter regions argue in

favour of the major relevance of other Hcy induced mechanisms acting on iNOS gene

expression variation, rather than, a direct effect of Hcy-induced CpG methylation on iNOS

gene expression.

KEYWORDS:

Homocysteinemia; Coronary Artery Bypass Grafting; Inducible Nitric Oxide

Synthase.

309

То cite this abstract, please use the following information: Rodriguez-Esparragón, Francisco, Serna-Gómez, Jaime, Hernández-Trujillo, Yaridé, Buset-Ríos, Nisa, García-Bello, Miguel, Hernández-Velázquez, Érika, et al; Methylated region analysis of the iNOS gene in internal mammary artery (IMA) and aortic fragments from mild homocysteinemic patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG) [abstract]. Journal of Clinical Hypertension 2012;14 Suppl 1:212.



4. Francisco Rodríguez-Esparragón, Jaime A. Serna-Gómez, Yaride Hernández-Trujillo, Nisa Buset-Ríos, Miguel A. García-Bello, Érika Hernández-Velázquez, José Carlos Rodríguez-Pérez. Unidad de Investigación y Servicio de Nefrología. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín (HUGC Dr. Negrín). Universidad de Las Palmas (ULPGC). Pacientes con hiperhomocisteinemia moderada sometidos a revascularización coronaria. Evaluación de proteínas S-homocisteiniladas en fragmentos de arteria mamaria interna. Comunicación presentada en el XLII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología (SEN) y VII Congreso Iberoamericano de Nefrología. Octubre 6-9 de 2012. Maspalomas, Gran Canaria, España y publicado en el Volumen 32-Suplemento 3-2012 de la revista de la Sociedad Española de Nefrología (Resúmenes del XLII Congreso Nacional de la SEN).

Introducción

La homocisteína (Hcy) es un factor de riesgo cardiovascular independiente. La insuficiencia renal, ciertas deficiencias nutricionales y la variante 677T en homocigosis del gen MTHFR se asocian, entre otros determinantes, con niveles altos entre moderados e intermedios de Hcy. Algunos autores sugieren comportamientos diferentes de la Hcy plasmática respecto a la unida a la pared mediante residuos de cisteína (S-homocisteinilación).

Objetivos

Evaluar en fragmentos de arteria mamaria izquierda (AMI) procedentes de pacientes sometidos a cirugía de revascularización coronaria, los niveles de proteínas homocisteiniladas.

Métodos

Los niveles de homocisteína plasmática total se midieron mediante HPLC. Los niveles de proteínas homocisteiniladas se determinaron, como ha sido descrito con anterioridad por Perna et al. (*Kidney International*, 2006) con modificaciones.

Resultados

Evaluamos un total de 192 pacientes (86,7% hombres) con una edad media de 64,1 \pm 7,4 años. La concentración plasmática media de homocisteína (tHcy) fue de 12,96 \pm 3,9 μ M. Todos los pacientes evaluados mostraron valores normales de ácido fólico y vitamina B12. Los niveles de ácido fólico correlacionaron de forma inversa con los niveles de tHcy (r = -0,362; p = 0,04). Confirmamos la presencia de homocisteína-S-proteína (Hcy-S-proteína) en 66 (34,3%) de los fragmentos de AMI evaluados. Por el contrario, no pudimos detectar proteínas unidas a homocisteína mediante enlace amida. El valor medio de Hcy-S-proteínas fue de 16,44 \pm 31,5 μ M. El valor medio ajustado al contenido proteico del homogeneizado fue de 38,6 \pm 49 (μ M/ μ g proteína). Los niveles de tHcy no correlacionaron con los niveles de Hcy-S-proteína en fragmentos AMI. Es más, no encontramos correlaciones significativas cuando evaluamos la concentración de tHcy o la de Hcy-S-proteína con el grado de metilación en el promotor del gen Ddah2.

Conclusiones

Los valores de Hcy-S-proteína no correlacionaron con los valores de tHcy en fragmentos de AMI. Nuestros datos confirman los de otros autores, en el sentido de que la Hcy que se une a residuos proteicos en la pared arterial se comporta de manera independiente de la tHcy.



Unidos más allá del habla



2012

Pacientes con hiperhomocisteinemia moderada sometidos a revascularización coronaria. Evaluación de proteínas S-homocisteiniladas en fragmentos de arteria mamaria interna

Francisco Rodríguez-Esparragón 1,3, Jaime A. Sema-Gómez 1, Yaride Hernández-Trujilo 1, Nisa Busel-Ríos 1 Miguel A. García-Bello 1, Érita Hernández-Velazquez 1, José Carlos Rodríguez-Pérez 1, 2,3 1 Unidad de Investigación, 2 Servicio de Nefrología, Hospital Universidan de Gran Canana Dr. Negrín (HUGC) Dr. Negrín) 3 Universidad de Las Palmas (ULPGC)

OBJETIVOS / Objetives

La homocisteína (Hcy) es un factor de riesgo cardiovascular independiente. insuficiencia renal, ciertas deficiencias nutricionales y la variante 677T en homocigosis el gen MTHFR se asocian, entre otros determinantes, con niveles altos entre moderados e intermedios de Hcv. Algunos autores sugieren comportamientos diferentes de la Hcy plasmática respecto a la unida a la pared mediante a residuos de cisteína (Shomocisteinilación) o lisina homocisteinilación).

Objetivos

Evaluar en fragmentos de arteria mamaria izquierda (AMI) provenientes de pacientes sometidos a cirugia de vascularización coronaria los niveles de proteínas homocisteiniladas.

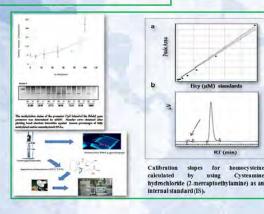
MÉTODOS / Methods

Se obtuvieron muestras de hombres y mujeres sometidos a CABG en el Hospital Universitario de Gran Cana Negrin. Las muestras obtenidas de pacientes CABG consistieron en fragmentos de arteria mariaria interna (AMI) y fragmentos (punch) aórticos. Se obtuvieron en aquellos casos en que fue posible según criterios cuando quirúrgicos. La indicación de bypesa coronario se basó en el estàndar de criterios clínicos y angiográficos, los criterios de inclusión fueron la indicación de cinugia de CABG, psicientes en los que la iNA se utilizó cono el injerto de elección pusa la revascularzación y la obtención del consentimiento informado por escrito. Los criterios de exclusión fueron el uso de injerto no IMA, la negativa a participar en el estudio y no cumplimentación de los criterios de inclusión.

Ensayo de metabolitos

Los nivelse de proteinas homocisteiniladas en fragmentos IMA se midieron como se describe por Perna et al, 2006. La homocisteina plasmática total (Ht-cy) se definió como la concentración total de Hcy después de la escisión reductiva cuantitativa de todos los enlaces disulfuro y los niveles se midieron por HPLC y inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA) método (Abbot división Diagnostic). Hubo una excelente correlación entre los métodos. Plasma vitamina B12 y ácido fólico se determinaron con el ensayo enzimático de microparticulas y la técnica de captura iónica, respectivamente. El método de HPLC fue lineal hasta 100 mmol / L y demostró ser sensible con un límite de detección de 5 mol / L de D / L-homocisteina

El ADN extrado de las muestras AMI y el de mezclas de estándares completamente metilado y completamente no metilado (mezclado en distintas proporciones) fue modificado por tratamiento con bisufito y posteriormente amplificado mediante PCA anidad e específica de metilación de acuerdo al método descrip por Zhang el al. 2007.



RESULTADOS / Results

Evaluamos un total de 192 pacientes (86.7 % hombres) con una edad media de 64.1±7.4 años. La concertración plasmática media de homocisteínna (tHcy) fue de 12.96±3.9 µM. Todos los pacientes evaluados mostraron valores normales de ácido fólico y vitamina B₁₂. Los niveles de ácido fólico correlacionaron de forma inversa con los niveles de tHcy (p = -0.362; p = 0.04). Confirmamos la presencia de homocisteína-S-proteína (Hcy-S-proteína) en 66 (34,3 %) de los fragmentos AMI evaluados. Por el contrario no pudimos detectar proteínas unidas a homocisteína mediante enlace amida. El valor medio de Hcy-S-proteínas fue de 16.44±31.5 µM. El valor medio ajustado al contenido proteico del homogeneizado fue de 38.6±49 (μM/μg proteina). Los niveles de tHcy no correlacionaron con los niveles ce Hcy-S-proteína en fragmentos AMI. Es más, no encontramos correlaciones significativas cuando evaluamos la concentración de tHcy o la de Hcy-S-proteína con el grado de metilación en el promotor del gen Ddah2.

CONCLUSIONES / Conclusions

Observamos que los valores de Hcy-S-proteína no correlacionaron con los valores de tHcy en fragmentos de AMI .Nuestros datos confirman los de otros autores en el sentido de que la Hcy que se une a residuos proteicos en la pared arterial se comporta de manera indçependiente de la tHcy.

REFERENCIAS / References

Cameron A. Davis KB, Green G. Schaff HV. Coronary bypasis suspery with internal-horazio-artery grafts-effects on survival over a 15-year period. N. Engil J. Med 1990;334(4):218-219.

Zuli A. Hare DL. Horrigan M. Buoton BE: The resistance of the IBM to attendedness register to the suspense of the IBM to attended with its higher effOS, ACE and ETA recogitor emmunosacide/s Antensides Terrori View Biol 2003/23(7):1308.

The predicts martistly independently of traditional risk factors and C-recolute protein: patients with analographically defined. Circulation 2000/10(21):1275-32.

Petra are: Seen E. John Der Jo



11 PACIENTES CON HIPERHOMOCISTEINEMIA MODERADA SOMETIDOS A REVASCULARIZACIÓN CORONARIA. EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS S-HOMOCISTEINILADAS EN FRAGMENTOS DE ARTERIA MAMARIA INTERNA

F. RODRÍGUEZ ESPARKAGÓN, J. SZRNA GÓMEZ, Y. HERNANDEZ TRUJILLO, N. BUSET RÍOS., M. GARCÍA BELLO, E. HERNANDEZ VELÁZQUEZ, G. ANTÓN PEREZ, J.C. RODRÍGUEZ PEREZ, "UPICAD DE INVESTICACIÓN, HOSPITAL UNIVERSITATIO DE GRAN CANARIA DE NEGRIN, LAS PALMAS, "NETROLOGÍA, HOSPITAL UNIVERSITATIO DE GRAN CANARIA DE NEGRIN, LAS PALMAS, UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS.

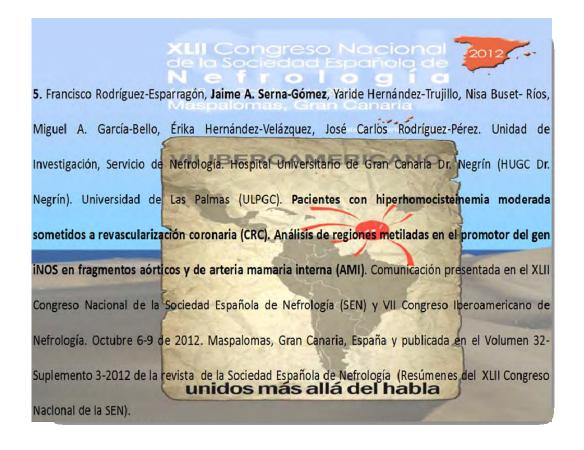
Introducción: La homocisteina (Hcy) es un factor de riesgo cardiovascular independiente. La insuficiencia remal, ciertas deficiencias nutricionales y la variante 6777 en homocigosis el gen MTHR se asocian, entre otros determinantes, con nivelles altos entre moderados e intermedios de Hcy. Algunos alsores sugieren comportamientos diferentes de la Hcy plasmática respecto a la unida a la pared mediante residuos de cisteina (5-homocisteinilación) o lisma (M-homocisteinilación).

Objetivos: Evaluar en fragmentos de arteria mamaria izquierda (AMI) procedentes de pacientes sometidos a cirugía de vascularización coronaria los niveles de proteínas homocisterialadas.

Métodos: Los niveles de homocisteiria plasmática total se midleron mediante HPLC. Los niveles de proteínas homocisteiniladas, como ha sido descrito con antenoridad por Perna et al. (Kidney International, 2006) con modificaciones.

Resultados: Evaluamos un total de 192 pacientes (86,7% hombres) con una edad media de 64,1 ± 7.4 años. La concentración plasmática media de homocateina (14kg) fue de 12,96 ± 3,9 μ M. Todos los pacientes evaluados mostranon valores normales de ácido folicio y vitarimas B12. Los niveles de acido folico correlacionaron de forma inversiz con los niveles de tHcy (r=-0.362; p=0.04). Confirmamos la presencia de homocateina-5-proteina (Hcy-5-proteina) en 66 (34,3%) de los fragmentos AMI evaluados. Por el contrario, no pudimos detectar proteinas unidas a homocateina mediante enface amida El yalor medio de Hcy-5-proteinas fue de 16,44 ± 31.5 μ M. El valor medio ajustado al contenido proteico del homogeneizado fue de 38,6 ± 49 (μ M/pg proteina). Los niveles de tHcy no correlacionaros con los inveles de Hcy-5-proteina en fragmentos AMI. Es más, no encontramos correlaciones significativas cuando evaluamos la concentración de tHcy o la de Hcy-5-proteina con el grado de metilación en el promotor del gen Ddah2.

Conclusiones: Los valores de Hcy-S-proteina no correlacionaron con los valores de tHcy en fragmentos de AMI. Nuestros datos confirman los de otros autores en el sentido de que la Hcy que se une a residuos proteccos en la pared arterial se comporta de manera independiente de la tHcy.



Introducción

La aterosclerosis, la enfermedad renal y la hipertensión arterial se asocian con incrementos en la expresión del gen iNOS. *In vitro*, en una gran variedad de tipos celulares es difícil lograr esta inducción a la exposición a citocinas. Aunque no se han caracterizado islas CpG en el promotor del gen iNOS, se han aportado evidencias de que la metilación de dinucleótidos CpG conjuntamente con la metilación del residuo de lisina 9 en la histona H3 están ligadas a la ausencia de inducción del mensajero del gen iNOS en células humanas.

Objetivos

Analizar el grado de metilación global y en regiones específicas en el promotor del gen iNOS en fragmentos aórticos y de arteria mamaria interna (AMI) en pacientes con

hiperhomocisteinemia moderada, sometidos a cirugía de revascularización coronaria (CRC).

Métodos

Las concentraciones de homocisteína plasmática total (tHcy) se evaluaron por HPLC. El grado de metilación global se determinó analizando la secuencia completa del promotor del gen humano iNOS y diseñando *primers* específicos para metilación (MSP). En una segunda aproximación, la secuencia del promotor del gen iNOS, para lo cual se desarrolló un protocolo de Sensitive Melting after Real Time-Methylation Specific PCR (SMART-MS-PCR).

Resultados

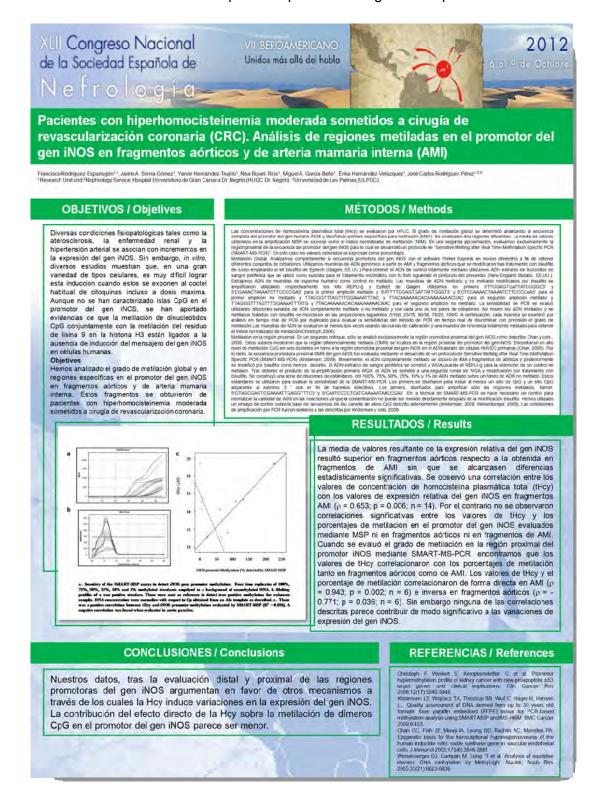
La media de valores de la expresión relativa del gen iNOS resultó superior en fragmentos aórticos *versus* fragmentos de AMI. Se observó una correlación entre los valores de tHcy con los valores de expresión relativa del gen iNOS en fragmentos AMI (r = 0,653; p = 0,006; n = 14). Por el contrario, no se observaron correlaciones significativas entre los valores de tHcy y los porcentajes de metilación en el promotor del gen iNOS, evaluados mediante MSP. Cuando se evaluó el grado de metilación en la región proximal del promotor iNOS mediante SMART-MS-PCR, los valores de tHcy correlacionaron con los porcentajes de metilación.

Los valores de tHcy y el porcentaje de metilación correlacionaron de forma directa en AMI (r = 0.943; p = 0.002; n = 6) e inversa en fragmentos aórticos (r = -0.771; p = 0.036; n = 6). Ninguna de las correlaciones contribuyó de modo significativo a las variaciones de expresión del gen iNOS.

Conclusiones

Nuestros datos, tras la evaluación distal y proximal de las regiones promotoras del gen iNOS, argumentan en favor de otros mecanismos a través de los cuales la Hcy induce

variaciones en la expresión del gen iNOS. La contribución del efecto directo de la Hcy sobre la metilación de dímeros CpG en el promotor del gen iNOS parece ser menor.





12 PACIENTES CON HIPERHOMOCISTEINEMIA MODERADA SOMETIDOS A CIRUGÍA DE REVASCULARIZACIÓN CORONARIA. ANÁLISIS DE REGIONES METILADAS EN EL PROMOTOR DEL GEN INOS EN FRAGMENTOS AÓRTICOS Y DE ARTERIA MAMARIA INTERNA

F. RODRÍGUEZ ESPARRAGÓN', J. SERNA GÓMEZ', Y. HERNÁNDEZ TRUJILLO', N. BUSET RÍOS', M. GARCÍA BELLO', E. HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ', D. RAMÍNEZ MEDINA', J.C. RODRÍGUEZ PÉREZ' (INDIAD DE MVESTIGACIÓN, HOSPITAL UNIVERSITARIO DE GRAN CANARIA DR. NEGRÍN, LAS PALMAS, 'NEFROLOGÍA, HOSPITAL UNIVERSITARIO DE GRAN CANARIA DR. NEGRÍN, LAS PALMAS, 'NEFROLOGÍA, HOSPITAL UNIVERSITARIO DE GRAN CANARIA DR. NEGRÍN, LAS PALMAS, UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS.

Introducción: La aterosclerosis, la enfermedad renal y la hipertensión arterial se asocian con incrementos en la expresión del gen INOS. In vitro, en una gran variedad de tipos celulares es dificil lograr esta inducción a la exposición a citoquinas. Aunque no se han caracterizado islas CpG en el promotor del gen INOS, se han aportado evidencias de que la metilación de dinucleótidos CpG conjuntamente con la metilación del residuo de lisina 9 en la histona H3 están ligadas a la ausencia de inducción del mensajero del gen INOS en células humanas.

Objetivos: Analizar el grado de metilación global y en regiones especificas en el promotor del gen INOS en fragmentos adritos y de arteria mamaria interna (AMI) en pacientes con hiperhomocisteinemia moderada, sometidos a cirugia de revascularización coronaria (CRC). Métodos: Las concentraciones de homocisteina plasmática total (tHcy) se evaluaron por HPLC. El grado de metilación global se determinó analizando la secuencia completa del promotor del gen humano iNOS y diseñando primers específicos para metilación (MSP). En una segunda aproximación, la secuencia del promotor del gen iNOS, para lo cual se desarrolló un protocolo de Sensitive Melting after Real Time-Methylation Specific PCR (SMARTMS-PCR).

Resultados: La media de valores de la expresión relativa del gen iNOS resultó superior en fragmentos aórticos vs. fragmentos de AMI. Se observo una correlación entre los valores de thicy con los valores de expresión relativa del gen iNOS en fragmentos AMI (r=0.653; p=0.006; n=14). Por el contrario, no se observatori correlaciones significativas entre los valores de titicy y los porcentajes de metilación en el promotor del gen iNOS, evaluados mediante MSP, Cuando se evaluó el grado de metilación en la región proximal del promotor iNOS mediante SMART-MS-PCR, los valores de titicy correlacionaron con los porcentajes de metilación. Los valores de titicy y el porcentaje de metilación correlacionaron de forma directa en AMI (r=0.943; p=0.002; n=6) e inversa en fragmentos aórticos (r=-0.771; p=0.036; n=6). Ninguna de las correlaciones contribuyen de modo significativo a las variaciones de expresión del gen iNOS.

Conclusiones: Nuestros datos, tras la evaluación distal y proximal de las regiones promotoras del gen iNOS, argumentan en favor de otros mecanismos a través de los cuales la Hoy induce variaciones en la expresión del gen iNOS. La contribución del efecto directo de la Hoy sobre la metilación de dimeros CpG en el promotor del gen iNOS parece ser misnor!



Homocysteinylated protein levels in internal mammary artery (IMA) fragments and its genotype-dependence. S-Homocysteine-induced methylation modifications in IMA and aortic fragments Francisco Rodríguez-Esparragón, Jaime Alberto Serna-Gómez, Érika Hernández-Velázquez, Nisa Buset-Ríos, Yaridé

Molecular and Cellular Biochemistry An International Journal for Chemical Biology in Health and Disease

ISSN 0300-8177

Mol Cell Biochem DOI 10.1007/s11010-012-1387-7





Mol Cell Biochem (2012) 369:235-246 DOI 10.1007/s11010-012-1387-7

Homocysteinylated protein levels in internal mammary artery (IMA) fragments and its genotype-dependence. S-Homocysteine-induced methylation modifications in IMA and aortic fragments

Francisco Rodríguez-Esparragón · Jaime Alberto Serna-Gómez · Érika Hernández-Velázquez · Nisa Buset-Ríos · Yaridé Hernández-Trujillo · Miguel A. García-Bello · José C. Rodríguez-Pérez

Received: 6 December 2011/Accepted: 30 June 2012/Published online: 14 July 2012 © Springer Science+Business Media, LLC. 2012

Abstract The resistance of internal mammary artery (IMA) toward atherosclerosis is not well understood. In plasma, homocysteine (Hcy) occurs in reduced, oxidized, homocysteine thiolactone and a component of proteins as a result of N- or S-homocysteinylation. We evaluated S/N-homocysteinvlated protein levels in IMA fragments of patients undergoing coronary artery bypass grafting, and whether they were affected by genetic common variants. We tested whether tHcy, Hcy-S-protein levels, genotypes or Hcy-induced methylation modifications were related to differences in iNOS, Ddah2, and eNOS gene expression between territories. A small percentage of Hcy-S-proteins were found in IMA fragments. The Mthfr C677T (rs1801133) and Pon-1 Leu55Met (rs854560) variants were associated with Hcy-S-proteins. We observed a gradual difference according to Hcy-S-protein levels in the methylation degree of the Ddah2 gene promoter in aortic, but not in IMA, fragments. No correlation between the degree of methylation and the Ddah2 gene expression

levels was found in both types of analyzed fragments. Total Hcy but not Hcy-S-proteins correlated with iNOS promoter methylation. Analyzed variants seem to contribute to the in vivo Hcy binding properties to IMA. The contribution of the Hcy-derived methylation modifications to Ddah2 and eNOS gene expression seems to be tissue-specific and independent of the Ddah2/ADMA/eNOS pathway. Hcy-derived methylation modifications to the iNOS gene promoter contribute to a lesser extent to iNOS gene expression.

Keywords Homocysteine - Homocysteinylation -Gene polymorphisms - Gene expression - Methylation

Introduction

Coronary artery bypass grafting (CABG) is the most common procedure for relieving angina and reducing the risk of death from coronary artery disease [1]. Several factors have been described that positively affect long-term graft survival. Among these is the use of internal mammary artery (IMA), commonly the graft of choice for the coronary artery bypass conduit because of its resistance to developing atherosclerosis both before and after bypass grafting [1, 2]. At present, the reasons for IMA resistance to atherosclerosis are not completely understood. Studies have found that an increase from moderate to intermediate levels of homocysteine (Hcy) constitute a graded and independent cardiovascular risk factor [3]. Methylenetetrahydrofolate reductase (Mthfr) reduces 5,10-methyltetrahydrofolate to the main circulating form of folate and the methyl donor for Hcy remethylation. The Mthfr C677T variant increases Hcy in subjects with the TT genotype relatively, as has been confirmed in association studies and genome-wide association studies [4].

F. Rodríguez-Esparragón (□) : É. Hernández-Velázquez · N. Buset-Ríos · Y. Hernández-Trujillo · M. A. García-Bello · J. C. Rodríguez-Pérez · Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín (HUGC Dr. Negrín), Las Palmas, Gran Canaria, Spain e-mail: frodesp@gobiernodecanarias.org

F. Rodríguez-Esparragón · J. C. Rodríguez-Pérez Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Las Palmas, Gran Canaria, Spain

J. A. Serna-Gómez

Servicio Cirugía Cardiovascular, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas, Gran Canaria, Spain

J. C. Rodríguez-Pérez Servicio de Nefrología, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas, Gran Canaria, Spain

Total Hcy causes endothelial dysfunction by inducing oxidative stress, compromising nitric oxide (NO) bioavailability. However, increased Hcy also exerts other deleterious effects [3, 5]. S-adenosyl methionine (SAM) constitutes an important methyl group donor, playing an essential role in enzymatic transmethylation [6]. A major product of methyl transfer reactions is S-adenosyl homocysteine (SAH), which is hydrolyzed to adenosine and Hcy. Therefore, an increased level of Hcy interferes with DNA methylation modification and gene expression by inducing hypomethylation and downregulation of the intracellular SAM/SAH ratio [6]. Hey can also be harmful if it induces homocysteinlylation [7]. Protein homocysteinvlation is the binding of Hey to proteins and can occur several ways. The oxidation of thiol groups, mediated by Hey in its free form, termed protein-S-homocysteinylation in particular directed towards cysteine (Cys) residues [8]. The acylation of free amino groups, termed protein-N-homocysteinylation, in particular, the binding of Hey to the amino group of lysine residues and the terminal amino group of proteins mediated by Hcy thiolactone [9].

Human paraoxonase (Pon1) is synthesized in the liver and in serum is closely associated with High Density Lipoprotein fractions. Human Pon1 gene polymorphisms provide functional properties to PON1 enzyme affecting its Hcy-thiolactonase activity [10] and enzyme concentration, respectively [11].

Impaired NO synthesis occurs following accumulation of the endogenous nitric-oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine (ADMA) and NG-methyl-L-arginine (L-NMMA) [12]. ADMA is produced from proteolysis of proteins. Dimethylated arginine residues are formed post-translationally by the transference of methyl groups from SAM, thus linking ADMA generation with Hcy formation [13]. Elevated ADMA concentration was found to be associated with endothelial dysfunction. Humans contain two distinct Ddah genes. Ddah2 is preferentially expressed in highly vascularized tissues [14]. Several studies have linked dose-dependent Hcy effects in endothelial cells, associated with an increase in ADMA, DDAH enzyme activity impairment and a reduction in NO bioavailability [5, 15].

We evaluated the contribution of some gene polymorphisms in gene coding for key enzymes of the Hcy metabolisms to the protein-homocysteinylated levels in IMA fragments. Some in vitro findings link Hcy levels with methylation modifications at the Ddah2 gene promoter with an altered DDAH2 synthesis and these with eNOS gene expression variations [15]. Also, methylation modifications at the iNOS gene promoter contribute to iNOS gene expression variations [16]. Accordingly, in IMA and punch aortic fragments of CABG patients, we evaluated whether plasma tHcy, homocysteinylated protein levels or genotypes correlated with methylation modifications at the Ddah2 gene promoter as well as with key histones known to significantly contribute to eNOs gene transcription. Also methylation modifications at CpG sites in the iNOS gene promoter and its contribution to iNOS gene expression variations were analyzed.

Methods

Patients and tissue samples

Specimens were collected from men and women undergoing CABG at Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Specimens collected from CABG patients included IMA and aortic punches (when they were surgically available). CABG indication was based on standard clinical and angiographic criteria. The inclusion criteria included a surgical indication of CABG, IMA the only graft used for revascularization, and the patients' informed written consent. Exclusion criteria were any graft other than IMA, refusal to participate in the study, and not fulfilling inclusion criteria.

There were no significant differences in the demographic characteristics and medication among patients according to evaluated genotypes. There were no significant differences between the overall patients and the subgroup of patients from whom both IMA and aortic punch fragments were available. Specimens were frozen and stored at $-80~^{\circ}\text{C}$ until further processing. All patients gave informed written consent for the use of their tissue samples. This study was approved by the Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín Committee for Clinical Investigation in accordance with Spanish legislation. Research was carried out in compliance with the Helsinki Declaration (http://www.wma.net/e/policy/b3.htm).

Metabolite assays

Homocysteinylated proteins in IMA fragments were measured as described [17]. To test the ability to detect S- and N-homocysteinylated proteins in our system, plasma proteins were used. Their presence was effectively confirmed. Plasma total homocysteine (tHcy) was defined as the total concentration of Hcy after quantitative reductive cleavage of all disulfide bonds and levels were measured by HPLC and fluorescence polarization immunoassay (FPIA) method (Abbot Diagnostic Division). There was an excellent correlation between methods. Plasma vitamin B₁₂ and folate were determined with the microparticle enzyme assay and the ionic capture technique, respectively. The HPLC method was linear up to 100 μmol/L and proved to be sensitive with a detection limit of 2.5-5 μmol/L for ro/L-homocysteine.

Genotyping

Genetic variants C677T of the MTHFR gene (rs1801133, g.14783C>T, p.Ala222Val) and Paraoxonase 1 (PON1) Gln192Arg (rs662, g.21439A>G, p.Gln192Arg) and Leu55-Met (rs854560, p.Leu55Met, g.12801T>A) and Ser311Cys of the Paraoxonase 2 (PON2) (rs7493, g.34610C>G, p.Ser311-Cys) were genotyped as described [11, 18, 19].

Gene expression analysis

Total RNA was prepared from vascular homogenates using TRIZOL reagent. Reverse transcription was carried out using iScript cDNA synthesis kit (Biorad) according to the manufacturer's instructions. Gene expression levels were compared according to studied subject and among territories. Differences in gene expression for a given territory were analyzed according to genotypes. Analysis was performed by the ΔΔCT method. Target cDNAs were quantified in a Light Cycler device using Taqman or SYBR green methodology. Taqman-based amplification of the eNOS and iNOS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genes was performed with primers and probes as described [16, 20]. By using SYBR green, an alternatively 226 base pair (bp) fragment of the eNOS gene was amplified with the primers 5'-CCATGTTACTGTGCGTCCAC-3' and 5'-TGA TGCATTGGATCTTTGGA-3'; and a 158 bp fragment of the iNOS gene with the primers 5'-ACAAGCCTACCCCTCC AGAT-3' and 5'-TCCCGTCAGTTGGTAGGTTC-3'. The fragments of the DDAH2 gene were amplified as described [15]. Normalization was performed against a 147 bp amplified fragment of the GAPDH with the forward primer 5'-GGCCTCCAAGGAGTAAGACC-3' and the reverse primer 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'. PCR product specificities were analyzed by melting curve analysis and by standard agarose gel electrophoresis.

Chromatin immunoprecipitation and eNOS proximal promoter region amplification

Arteries were allowed to thaw on ice and cross-linked with 5 % formaldehyde for 5 min. Fragments were homogenized and nuclear and cytosolic fractions extracts prepared by using a nuclear extraction kit from Active Motif according to the manufacturer's instructions. Nuclear lysates were sonicated on ice. As a positive control (input) undiluted aliquots were retained for further processing in parallel with all the other samples at the reversal of the crosslinked step. Antibodies were purchased from Abcam (ab32356 and ab1012) and Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA). ChIP assays were performed by adding to the chromatin complexes either 2 µL of rabbit monoclonal antibody to Histone H3 dimethyl K4 (H3K4me2) or

mouse monoclonal antibody to Histone H3 trimethyl K4 (H3K4me3) or without any antibodies. This was done overnight at 4 °C. Controls were made by adding 2 μL of normal rabbit or mouse IgGs, respectively, DNA samples were recovered and subjected to analysis by real-time PCR amplification. The proximal region (-166 to -26) of the eNOS gene was amplified using primers and probes previously described [20]. Also the eNOS proximal promoter fragment was amplified by conventional PCR with the same primers before reaching the plateau cycle. Band patterns of inputs, targets, and controls were analyzed by densitometry using images scanned with Adobe Photoshop CS2 software.

iNOS promoter methylation analysis

We used two different approaches to analyze iNOS promoter methylation status. The first approach was done analyzing the entire iNOS gene promoter sequence with the Methyl Primer Express Software under different modes in order to obtain different sets of primers. Thus, for the entire iNOS methylation analysis, we first used genomic DNA samples from both IMA and punch aortic fragments that were modified by sodium bisulfite using the EpiTech Bisulfite kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's protocol. To obtain fully methylated control DNA, peripheral blood leukocyte (PBL) DNA was used as substrate for M.SstI treatment, as described by the manufacturer (New England Biolabs, USA). DNA from human sperm samples was extracted as unmethylated controls. Bisulfite treated methylated and unmethylated DNA samples were amplified using the REPLI-g and the Epitect Whole Bisulfitome Amplification kits from Qiagen, respectively. Primer sequences were: 5'-TTGGAGTGATT ATCGGGC-3' and 5'-CGAAACTAAAATCTTCCCCGA-3' for the methylated amplicon and 5'-ATTTTGGAGTGAT TATTGGGT-3' and 5'-CTCCAAAACTAAAATCTTCCCC AA-3' for the unmethylated amplicon and TTAGGGTT-TAGTTTGGAAAATTTAC and TTACAAAAAACACA AAAAAAACGAC for the methylated amplicon and TTAGGGTTTAGTTTGGAAAATTTATG and TTACAAA AAACACAAAAAAAAACAAC for the unmethylated amplicon. Initial experiments to evaluate PCR sensibilities were evaluated using serial dilutions of fully methylated or completely unmethylated DNA with each primer pair. Bisulfite treated methylated and unmethylated DNAs were mixed at the following ratios: 0/100, 25/75, 50/50, 75/25, 100/0. Each sample was then examined by real-time PCR analysis in duplicate to evaluate the sensitivity of the real-time PCR method in order to discriminate the degree of methylation accurately. DNA samples were evaluated at least twice in duplicate series using standard curves and a fully methylated reference sample to obtain the normalized index of methylation (NIM) [21].

In the second approach, we only analyzed the proximal promoter region as described by Chan et al. [16]. These authors showed that the human differentially methylated region (DMR) is mainly confined to proximal promoter regions in the proximal iNOS promoter. They found a high level of CpG methylation in six doublets surrounding the proximal iNOS promoter in DNA isolated from primary HUVEC cells [16]. Thus, methylation degree at the proximal DMR promoter iNOS sequence was assessed by a Sensitive Melting after Real Time-Methylation Specific PCR (SMART-MS-PCR) [22]. Briefly, fully methylated DNA was obtained from IMA and punch aortic fragments and bisulfite modified as described above. DNA extracted from peripheral blood was subjected to WGA using the REPLI-g as described for creation of an unmethylated control. Primary WGA was subjected to a second round of WGA and then modified by bisulfite treatment. A standard dilution series of 100, 75, 50, 25, 10, and 1 % methylated DNA in a background of unmethylated DNA was prepared. These standards were used for assessing the sensitivity of the SMART-MS-PCR. Primers were designed to include at least a CpG site and a CpG site adjacent to the 3'-end in order to make the primers as selective for methylated template as possible. Non-CpG cytosines were included in the primer sequences. Primers, designed to amplify only methylated templates, were: 5'-GTAGCGAGTCGAAA ATTGAGGTTTC-3' and 5'-CAATCCCCTCATCAAAAA TAACCGA-3'. In SMART-MS-PCR a control assay is needed to normalize for DNA input in the reactions as DNA concentration cannot be measured directly after bisulfite modification. We used a control assay based on Alu sequences depleted of CpG sites previously described [22, 23]. The cycling protocol and PCR conditions were as described [22].

DDAH2 methylation degree

Bisulfite treated DNA standard mixes and DNA samples were amplified by the nested methylation-specific PCR (MSP) previously described [15].

Statistical analysis

Distribution of continuous variables was expressed as mean \pm SD unless otherwise specified, and proportions were expressed as percentages. Bivariate analysis was performed by calculation of Spearman's correlation coefficient. Group comparisons were performed by using unpaired Student t test or the Mann–Whitney U test when appropriate. Intragroup comparisons were made using the Wilcoxon signed-ranks test. The association between

genotypes and Hcy-S-protein level was assessed by linear regression. Statistical analysis was performed with SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Results

Total homocysteine, S-/N-homocysteine-protein detection and genotype relationships in CABG patients

A total of 192 (86.7 % male) patients were analyzed with a mean age of 64.1 ± 7.4 years. Main patient characteristics are depicted in Tables 1 and 2. Mean tHcy plasma concentration was $12.96 \pm 3.9 \,\mu\text{M}$. Mean tHcy plasma levels varied according to MTHFR (C677T) genotypes, with a

Table 1 Main patient qualitative characteristics

Variable	N (%)
Men	39 (87)
Family history of coronary heart disease	24 (53)
Smoking status	
Never	10 (23)
Former >1 year	13 (29)
Former <1 year	10 (23)
Current	11 (25)
Dyslipidemia	40 (93)
Hypertension	34 (90)
Diabetes mellitus (DM)	22 (50)
Type 1 diabetes (TIDM)	4 (9)
Left main coronary artery disease	8 (18)
Number of affected coronary vessels	
Left main disease	1(2)
One-vessel and left main coronary artery disease	2 (4)
Two-vessel and left main coronary artery disease	1(2)
Three-vessel and left main coronary artery disease	4 (9)
One-vessel disease	1(2)
Two-vessel disease	9 (22)
Three-vessel disease	27 (60)
Left ventricular ejection fraction (LVEF)	
30-49 %	9 (20)
>49 %	36 (80)
Functional classification (NYHA)	
П	40 (91)
III	4 (9)
Functional classification (CCS)	
I	1(2)
П	26 (59)
III	13 (30)
IV	4 (9)

NYHA New York Heart Association, CCS Canadian Cardiovascular Society



Table 2 Main patient quantitative variable characteristics

Variable	Mean ± SD	P ₅₀ (P ₂₅ -P ₇₅)	Min-Max	KS (p)
Age (years)	64.09 ± 7.44	67 (58-70)	47-75	0.163 (0.004)
BMI (kg/m²)	28.27 ± 4.49	27 (26-30)	18-41	0.097 (0.200)
Total cholesterol (TC) (mg/dL)	159.67 ± 6.30	146 (129-187)	94-263	0.178 (0.002)
LDL (mg/dL)	88.50 ± 37.12	79 (63-109)	25-194	0.131 (0.067)
HDL (mg/dL)	40.23 ± 10.24	39 (34-45)	17-66	0.118 (0.159)
Triglycerides (mg/dl)	151.48 ± 50.02	148 (113-176)	52-278	0.097 (0.200)
Lp (a) (mg/dL)	25.91 ± 15.86	20 (18-32)	6-73	0.187 (0.001)
Apo A1 (mg/dL)	103.34 ± 21.12	103 (88-117)	58-145	0.059 (0.200)
Apo B (mg/dL)	80.82 ± 26.75	76 (63-96)	42-154	0.111 (0.200)
CT/HDL	4.19 ± 1.43	3.75 (3.21-4.68)	2.2-9.9	0.185 (0.001)
tHey (µmol/L)	14.13 ± 4.59	13.77 (10.57-16.58)	7.5-28.1	0.134 (0.057)
CRP (mg/dL)	1.27 ± 1.93	0.60 (0.10-1.0)	0.0-9.8	0.332 (0.0001)
Fibrinogen (mg/dL)	329.33 ± 85.13	329.6 (256.4-392.3)	167-565	0.098 (0.200)
Urea (mg/dL)	43.73 ± 15	40.0 (34.0-50.0)	24-98	0.160 (0.008)
Creatinine (mg/dL)	1.03 ± 0.7	0.84 (0.73-0.98)	0.5-4.2	0.314 (0.0001)
Folic acid (ng/mL)	8.32 ± 3.57	8.38 (5.80-9.49)	3.1-20.0	0.162 (0.007)
Vitamin B12 (pg/mL)	577.27 ± 230.65	584.20 (379.93-662.50)	266-1,319	0.185 (0.001)

KS Kolmogorov-Smimov, BMI body mass index, LDL low density lipoprotein, HDL high density lipoprotein, Lp (a) lipoprotein a, Apo AI apolipoprotein B, tHcy total plasma homocysteine, CRP C-reactive protein

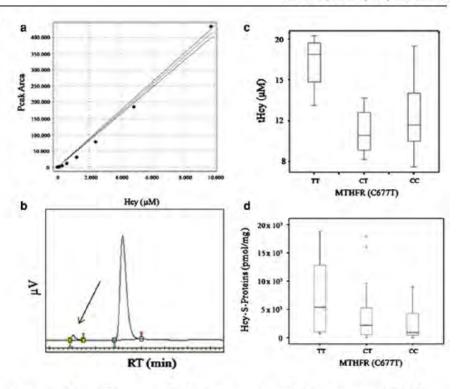
statistically significant difference (p = 0.011). Folic acid levels were inversely correlated with tHcy ($\rho = -0.362$; p = 0.04). Study participants had normal levels of folic acid and vitamin B12. We confirmed the presence of homocysteine-S-proteins (Hcy-S-protein) in 66 (34.375 %). of the analyzed IMA fragments from which vascular homogenates were prepared (Fig. 1a, b). By contrast, Hcy-N-proteins could not be detected in the analyzed vascular IMA homogenates. For any given patient, detection of Hcy-S-proteins was positive if it was found in at least two different HPLC chromatograms. The mean value of the Hcy-S-proteins was $16.44 \pm 31.5 \,\mu\text{M}$ with an adjusted mean ratio of 38,637 ± 6,918 (pmol/mg protein). Plasma tHcy levels were not statistically associated with vascular Hcy-S-protein levels. Table 3 shows genotype data frequencies and percentages, the logarithm of the ratio of Hcy-S-protein according to genotype as well as the frequencies of Hcy-S-protein found according to the genotypes of the analyzed polymorphisms. There was no statistical correlation between Hcy-S-protein bound to protein levels expressed as ratio in IMA fragments and the Gln192Arg genotypes of the Pon1 and Ser Cys311 genotypes of the Pon2 gene. However, both Mthfr C677T genotypes and PON1 Leu55Met contributed significantly to Hcy-S-protein level variation (Fig. 1c, d). By linear regression analysis introducing all analyzed genotypes, we determined that overall contribution of genotypes to S-Hcy variation on IMA fragments was estimated to be 30 % (p = 0.009). In the selected model, PON1 Gln192Arg genotypes were excluded from the equation.

Gene expression differences among territories

The relative gene expression of the eNOS, iNOS, and Ddah2 genes were compared according to territories as well as according to genotypes in each analyzed territory. We found a significant statistical difference in the Ddah2 relative gene expression between analyzed fragments with higher levels observed in punch aortic fragments with respect to IMA fragments (rank equality Wilcoxon test, p = 0.003). Mean eNOS gene expression among analyzed fragments was highly correlated (p = 0.001), but did not show a statistical difference. Nevertheless, slightly lower eNOS mean relative gene expression was observed in punch aortic fragments with respect to those observed in IMA fragments. In contrast, mean iNOS relative gene expression was slightly higher in punch aortic fragments with respect to the mean value observed in IMA fragments. Again, the difference did not reach statistical significance.

No significant differences according to Pon 1 (Leu55-Met) and Mthfr (C677T) gene variants were found for the eNOS and iNOS genes in either IMA or punch aortic fragments. However, we found that Ddah2 relative gene expression seems to be dependent on Mthfr C677T genotypes. By using a nonparametric log-linear model, the contribution of C677T genotypes was significant

Fig. 1 a Calibration slopes for homocysteine calculated by using Cysteamine hydrochloride (2-mercaptoethylamine) as an internal standard (IS). b Selected chromatogram showing Hcy-S-protein content from an IMA fragment. Two peaks belonging to Hey (arrow) and IS are showed, c, d Total Hey and Hey-S-protein levels differed according genotypes of the MTHFR in analyzed patients (p = 0.011; p = 0.01,respectively). Also Hey-S-protein levels differed according Leu55Met variant (p = 0.017) (not showed)



(p = 0.036). In addition, we observed graded eNOS gene expression according to Pon 1 (Gln192Arg) genotypes (p = 0.018). The contribution of genotypes to variations in gene expression was found in the aorta, but not in the IMA.

Total homocysteine (tHcy), S-homocysteine levels and degree of methylation in the Ddah2 gene promoter

There was a significant difference when percentages of methylation in the Ddah2 gene promoter in punch aortic fragments with respect to IMA fragments were compared (Fig. 2b). Negative, but not significant, correlations between tHcy and the degree of methylation in the Ddah2 gene promoter were observed according to analyzed fragments. Nevertheless, correlation was on the threshold of significance in a ortic punch (p = 0.055). No significant correlation between Hcy-S-protein levels and methylation degree at the Ddah2 gene was found in IMA fragments. Assuming that the concentration of protein-bound homocysteine in aortic fragments should not differ more than in proportion to that found in IMA, we correlated the values obtained in IMA with the degree of methylation in gene promoter in aortic Ddah2. A significant positive correlation between levels of Hcy-S-protein and the degree of methylation in the Ddah2 gene promoter was detected in punch aortic fragments ($\rho = 0.829$, p = 0.02, n = 10) (Fig. 2c).

Ddah2 gene promoter methylation degree and Ddah2 and eNOS genes expression

There was no statistically significant correlation between Ddah2 gene promoter methylation modifications and Ddah2 relative gene expression when evaluated either in IMA or punch aortic fragments. However, percentages of methylation modifications at the Ddah2 gene promoter correlated with eNOS gene expression levels ($\rho=0.563$; p=0.005). This correlation was observed in aortic punches but not in IMA fragments.

Total Hcy, S-homocysteine, and eNOS relative gene expression

We found that tHcy plasma values were positively related to eNOS gene expression variation in IMA ($\rho=0.591$, p=0.04, n=10) (Fig. 3a). A similar positive trend, although not reaching significance, was observed in punch aortic fragments. Again assuming proportional rather than qualitative difference, we correlated Hcy-S-protein obtained in IMA with respect to eNOS relative gene expression values. Thus, we found a significant but negative correlation between levels of Hcy-S-protein and the eNOS relative gene expression values in punch aortic fragments ($\rho=-0.464$, p=0.047, n=10). The correlation did not reach statistical significance when it was



Table 3 Genotype frequencies an mean S-Hcy levels according genotypes

Genotype	Frequency (%)	Log ratio (Mean ± SD) ²	S-Hcy-Proteins (%) ^b
PON1 Gln192Arg	(rs662)		
RR	11 (14.1)	2.87 ± 1.7	4 (36)
QR	30 (38.5)	2.9 ± 1.6	22 (73)
QQ	37 (47.4)	2.53 ± 1.6	25 (68)
Missing	2 (2.5)		
PON1 Leu55Met	rs 854560)		
LL	39 (48.8)	2.32 ± 1.6	22 (56)
LM	38 (47.5)	2.96 ± 1.6	27 (71)
MM	3 (3.8)	3.76 ± 2.0	2 (67)
Missing	0		
PON2 Ser311Ser	rs7493)		
CC	9 (12)	2.51 ± 1.8	4 (44)
CS	26 (32.5)	2.36 ± 1.45	13 (50)
SS	40 (53.5)	2.95 ± 1.59	33 (82.5)
Missing	5 (6.3)		
MTHFR Ala222V	al (rs1801133)		
TT	11 (14.1)	3.64 ± 1.4	7 (64)
CT	38 (48.7)	2.73 ± 1.7	24 (63)
CC	29 (37.2)	2.38 ± 1.5	20 (69)
Missing	2 (2.5)		

^a Ratio was estimated as μM of Hey-S-protein detected at least in two chromatograms to the protein content in μg of a given IMA homogenate

b Frequency and percentages of S-Hcy-protein levels detected for a given genotype of the analyzed polymorphisms

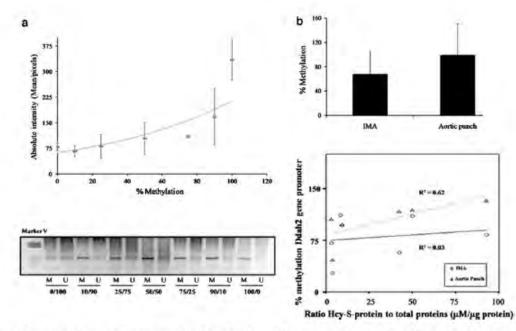
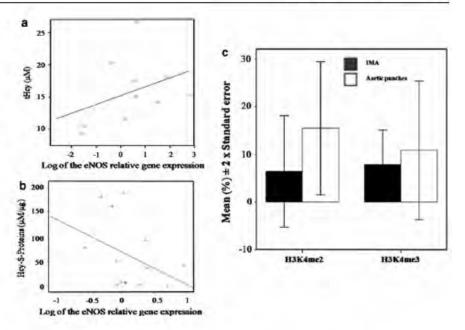


Fig. 2 a The methylation status of the promoter CpG island of the Ddah2 gene promoter was determined by nMSP. Standard curve obtained after plotting band absolute intensities against known percentages of fully methylated and/or unmethylated DNAs. b *Up*

Mean percentage of methylated CpG of the Ddah2 gene promoter obtained in IMA and aortic punch fragments. Down A significant correlation between Hcy-S-protein (μΜμg protein) and percentages of Ddah2 methylation in aortic punch fragments

Fig. 3 a There was a significant positive correlation between eNOS relative gene expression (log) and tHey plasma concentration in IMA fragments. b Hey-S-protein values did not correlated with eNOS relative gene expression. e eNOS methylation at histone H3 lysine 4 in IMA and aortic punch fragments. Data represent the mean ± 2× standard error



evaluated in IMA fragments. There were no significant differences in either eNOS H3K4me2 or H3K4me3 in IMA with respect to aortic punch fragments (Fig. 3c).

Histone 3 methylation at lysine 4 and eNOS gene expression

We evaluated the relative expression of eNOS gene in vascular homogenates from IMA fragments and aortic punches. Likewise, we immunoprecipitated the chromatin environment isolated from small fragments of both IMA and aortic punches with antibodies against H3K4me2 and H3K4me3. These are known to conform to part of an active transcriptional core at the eNOS proximal promoter. When we evaluated mean percentages of eNOS proximal promoter recovered bound to H3K4me, we found slightly lower levels in IMA homogenates compared to homogenates obtained in aortic punches. Nevertheless, none of the comparisons were significant (Fig. 3c). However, by evaluating eNOS gene expression data with the percentage of DNA recovered after immunoprecipitation, we found a significant correlation between H3K4me2 and eNOS gene expression in IMA fragments ($\rho = 0.692$; p = 0.013; n = 12) as well as between H3K4me3 and eNOS relative gene expression again in IMA fragments ($\rho = 0.638$; p = 0.024; n = 10). There were no significant correlations between eNOS gene expression and either H3K4me2 or H3K4me3 in punch aortic fragments.

Total Hcy, S-Hcy levels, iNOS promoter methylation degree and iNOS relative gene expression

Total plasma Hcy concentration was strongly related to iNOS gene expression in IMA fragments ($\rho = 0.653$; p = 0.006; n = 14). Methylation was evaluated at the iNOS gene promoter by MSP. We found that tHcy was not statistically correlated with iNOS gene promoter methylation percentages in either IMA or punch fragments. However, we observed a significant correlation when Hcy-Sproteins and normalized indexes of methylation (NIM) when evaluated in IMA fragment ($\rho = 0.886$; p = 0.01; n = 6). A trend toward significance was observed in punch aortic fragments. Interestingly, we did not find that NIM values were correlated with iNOS gene expression variations in IMA fragment; whereas, NIM values were highly correlated with iNOS gene expression variations in punch fragments ($\rho = 0.739$; p = 0.002; n = 16). When we assessed iNOS proximal promoter methylation by SMART-MS-PCR (Fig. 4a, b), tHcy levels were statistically correlated with iNOS gene promoter methylation percentages in either IMA or punch fragments. Total Hcy levels and methylation percentages values were directly correlated in IMA fragments ($\rho = 0.943$; p = 0.002; n=6) and inversely in punch a ortic fragments ($\rho=$ -0.771; p = 0.036; n = 6) (Fig. 4c). However, none of the described correlations contributed significantly to iNOS gene expression variations.

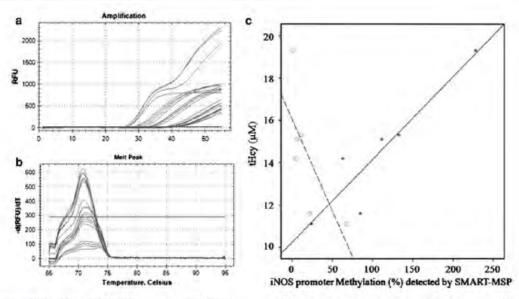


Fig. 4 a Sensitivity of the SMART-MSP assays to detect iNOS gene promoter methylation. Four time replicates of 100, 75, 50, 25, 10, and 1 % methylated standards amplified in a background of unmethylated DNA. b Melting profile of truly positive standards. These were used as reference to detect true positive methylation for unknown samples.

DNA concentrations were normalized with respect to Cp obtained from an Alu template as described. c There was a positive correlation between tHcy and iNOS promoter methylation evaluated by SMART-MSP ($R^2=0.856$). A negative correlation was found when evaluated in aortic punches

Discussion

We have found that S-Hcy-protein evaluation constitutes an effective gauge of the degree of Ddah2 gene promoter methylation. Likewise, we observed that the binding of S-Hcy-proteins to the IMA arterial wall seems to depend on—besides tHcy concentration—the HDL-associated enzyme paraxonase concentration, partially determined by the Pon1 Leu55Met variant. Unlike tHcy, we observed that levels of Hcy-S-protein gradually correlated with methylation degree at the histones "core" of the eNOS gene at moderate and intermediate concentrations of Hcy. The relative contribution of the described observations was minor in IMA fragments with respect to aortic fragments.

We assessed histone modifications rather than CpG islands in the eNOS gene because previous studies have shown that promoter methylation at eNOS promoter did not have an effect on nucleoprotein complex as deduced from EMSA studies [20]. Moreover, it has been shown that DNA methylation patterns of promoter sequences in eNOS transgenes did not differ in a cell-specific manner. However, a particular set of histone modification encompassed the eNOS core promoter and proximal downstream coding regions, which constituted a differentially modified chromatin domain, associated with functionally competent RNApolymerase II complexes within eNOS gene expressing cell types [20]. Likewise, in regard to the iNOS gene, the lack of CpG

islands has been described but the presence of CpG sites at the iNOS gene promoter likely to be methylated. Methylation at the iNOS seems to affect gene expression effectively, therefore, we evaluated the relevance of Hcy-S-protein levels to iNOS gene expression variation through methylation [16].

We observed that IMA associated Hcy-S-proteins did not correlate with plasma tHcy values. Previously, it has been observed that plasma tHcy was weakly correlated with vascular tHcy in IMA and saphenous vein fragments [24]. Thus, our data from IMA fragments support these authors' observations that suggested Hcy in the vascular wall behave partially independent from plasma. On the other hand, Pema et al. [17] found that Hcy-S-protein was significantly correlated to Hcy levels in the plasma of controls and uremic patients. We failed to obtain N-homocysteinylated proteins in IMA homogenates. It is possible that Hcy-N-protein levels in IMA were below the detection threshold that can be chromatographically detected given the limited amount of available tissue. It might, however, be related to an increased homeostatic plasticity of the IMA which also helps to block Hcy-S-protein binding. Since we found that Hcy-S-protein correlated with Pon1 Leu55Met and MTHFR C677T gene variants, it seems that these variants contribute to the Hcy-Sprotein binding properties to the vascular wall.

We found a statistically significant correlation between methylation percentages at the Ddah2 gene promoter and the Hcy-S-protein levels when evaluated in punch aortic fragments, but not in IMA fragments. However, Hcy-S-protein levels were not related to Ddah2 gene relative expression levels in the analyzed territories, while C677T genotypes contributed in a significant manner in IMA fragments. We also found that Ddah2 methylation patterns were unrelated to Ddah2 relative gene expression values in the analyzed territories. As stated, we observed that a different degree of Ddah2 gene promoter methylation negatively correlated with eNOS relative gene expression in aortic punch fragments, but positively in IMA fragments, whereas tHcy correlated positively with eNOS relative gene expression in either IMA and punch aortic fragments. Moreover, H3K4me2 and H3K4me3 were found to correlate with eNOS gene transcription in IMA but not in punch aortic fragments. Taking into account these correlations, it seems that Hcy-Sproteins rather than tHcy constitute a better predictor of gradual gene promoter methylation modifications. Data analysis also suggests a mechanism that links Hcy-S-proteins with promoter Ddah2 methylation and eNOS expression variations that seem to be independent of the DDAH2/ ADMA/eNOS pathway. This mechanism yields significant differential effects on the aorta with respect to the IMA where these changes appear to be less relevant. There are some possible arguments and mechanisms to explain the described association between methylation degrees at the Ddah2 gene promoter and eNOS relative gene expression levels, regardless of Ddah2 relative gene expression levels. First, our study has limitations: the small sample size might explain the absence of correlation by itself, along with the consideration of other non-evaluated transcriptional determinants. Also, the Ddah2 gene promoter methylation modifications that associate with diminished Ddah2 gene expression and consequently with ADMA increases have been found in vitro under hyperhomocysteinemic conditions (tHcy values > 100 μmol/L) [15]. Moreover, even under hyperhomocysteinemic conditions, authors have reported conflicting findings. Thus, it has been reported that high Hey treatment (Hcy > 100 µmol/L) decreased NO production but did not elevate ADMA or levels of Ddah1 or Ddah2 mRNA. This suggests that ADMA was not the major mediator of hyperhomocysteinemia-induced endothelial dysfunction [13]. Secondly, and as discussed, there are other possible mechanisms. What has been found so far at physiological Hcy concentrations seems to support a direct effect of Hcy over the DDAH2/ADMA/eNOS signaling pathway. Stuhlinger et al. [25] observed a dose-dependent fashion ADMA increase and diminished DDAH enzyme activity in bovine aortic endothelial cells exposed to moderate physiopathological doses (30 μM) of DL-Hcy. These authors observed that Hey did not change the expression of Ddahl. They could not evaluate the effect of Hcy on the DDAH2 isoform and concluded that Hey induced a change in the

expression of DDAH-2, However, the recent development of a global-DDAH1 gene-deficient mouse strain confirmed that DDAH1 is the required enzyme for metabolizing ADMA and L-NMMA in vivo, whereas DDAH2 had no detectable role for degrading ADMA and L-NMMA [26]. Therefore, the role that we have assigned to the Hcy-S-protein variations on eNOS gene expression might be explained by non-evaluated mechanisms acting on Ddah1 rather than on Ddah2.

The Mthfr gene 677T variant also appears in our study as marker of Ddah2 gene expression independent of Hcy-S-protein levels. As discussed previously by Sohn et al. [27], in vitro and in vivo studies have suggested that functional impact of the MTHFR C677T variant becomes apparent only in conjunction with low folate status. However, this and other authors have found cell-specific and paradoxical differences in methylation degrees unrelated to folate status. Our data suggests that the 677T variant acts as a marker of DDAH2 gene expression with partial independence from its known action reducing MTHFR activity are in accordance with these authors' observations.

When we analyzed the percentages of distal methylation in the promoter of iNOS, we found significant correlations between these values and the concentration of Hcy linked to the vascular wall in IMA fragment, whereas the correlation was on the threshold of significance in punch aortic fragments. Nevertheless, neither Hcy-S-protein nor iNOS promoter methylation correlated with iNOS gene expression in the evaluated territories. Therefore, these correlations might reflect that the determination of Hcy-S-protein levels constitute a better marker of iNOS promoter methylation on CpG dimers; however, the absence of a correlation between this degree of methylation and variations in the expression of the iNOS gene also signal that the distal modifications have no effect on gene transcription Instead, Chan et al. [16] showed that the DMR is located in the proximal promoter of the iNOS gene. When we analyzed this region by SMART-MSP, we found a direct correlation between tHcy levels and iNOS methylation that were, respectively, positive in IMA fragments and negative aortic punches. However, neither the percentage of methylation in IMA nor aortic punches significantly correlated with variations in the expression of iNOS, whereas tHcy was related to iNOS gene expression. As reported, the iNOS human gene is recalcitrant to induction in culture [16] and although cytosine methylation have been shown to be involved to a certain degree in the transcriptional regulation of the iNOS gene regulation [28], our data evaluating both distal and proximal iNOS promoter regions argue in favor of the major relevance of other Hcy induced mechanisms acting on iNOS gene expression variation rather than a direct effect of Hcy-induced CpG methylation on iNOS gene expression. Thus, Hey has been shown to

induce vascular inflammation by enhancing the expression of pro-inflammatory cytokines [29], decreases the bioavailability of nitric oxide (NO) [30], and is associated with increased production of reactive oxygen species (ROS) in endothelial and smooth muscle cells [31].

Homocysteinaemia is an independent risk factor for atherosclerosis [3]. Potential benefits of homocysteinelowering therapy stimulate clinical interest in measuring Hcy. However, the clinical relevance of different forms of Hcy, which may be involved in the modulation of hemostatic process, is not yet well-known. Previous works have shown that both Hcy in its reduced form and the most reactive form of Hcy-its thiolactone-may modify fibrinolysis, the coagulation process and the biological activity of blood platelets [7, 8]. As thiolactone is highly reactive chemically, it readily reacts with the ¿-amino group of protein lysine residue(s) to form stable amides, homocystamides or N-homocysteinylated proteins. The N-homocysteinylation of several proteins has been established [7]. On the contrary, other studies have shown the absence of N-homocysteinylation, but a significant level of S-homocysteinylation modification in several plasma proteins [32] and in low density lipoprotein (LDL)-apoprotein B [33]. S-homocysteinylation has been reported to enhance atherogenicity of lipoprotein [33]. Because of this, there is an increasing interest in the systematic characterization of S/N-homocysteinylated proteins and their potential as disease markers. We wanted to assess the degree of impairment of vascular wall proteins in IMA fragments and aortic fragments extracted from mild homocysteinemic patients undergoing CABG.

In conclusion, we observed that Hcy linked to the IMA vascular wall behaves differently than tHcy. In IMA, S-Hcy binding properties seem to depend on the MTHFR C677T and PON-1 Leu55Met genotypes. The absence of N-homocysteinylation and the diminishing relevance Hcy-induced methylation modifications in IMA with respect to analyzed aortic territories reveal that in IMA there is a more precise regulation of the hemostatic process. Moreover, comparison of the territories led us to conclude that the C677T variant associates with tissue-specific methylation modifications. Moreover, in the aortic fragments tested, methylation modification and changes in the eNOS gene expression seem to be at least partially independent of the DDAH2/ADMA/eNOS pathway.

Acknowledgments This work was supported by a grant from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) PI061080 of the Instituto de Salud Carlos III and in part by grants from Fundación Canaria de Investigación y Salud (FUNCIS) through a special agreements with Caja Rural de Canarias and Fundación Mapfre-Guanarteme.

Conflict of interest No competing financial interests exist.

References

- Cameron A, Davis KB, Green G, Schaff HV (1996) Coronary bypass surgery with internal-thoracic-artery grafts—effects on survival over a 15-year period. N Engl J Med 334(4):216–219
- Zulli A, Hare DL, Horrigan M, Buxton BF (2003) The resistance of the IMA to atherosclerosis might be associated with its higher eNOS, ACE and ET-A receptor immunoreactivity. Arterioscler Thromb Vasc Biol 23(7):1308
- Anderson JL, Muhlestein JB, Horne BD et al (2000) Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined. Circulation 102(11):1227–1232
- Tanaka T, Scheet P, Giusti B et al (2009) Genome-wide association study of vitamin B6, vitamin B12, folate, and homocysteine blood concentrations. Am J Hum Genet 84(4):477–482
- Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC (2005) Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol 289(6):H2649–H2656
- James SJ, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Caudill MA (2002) Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. J Nutr 132(8 Suppl):2361S–2366S
- Jakubowski H (1999) Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. FASEB J 13(15):2277–2283
- Sengupta S, Chen H, Togawa T et al (2001) Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine. J Biol Chem 276(32):30111–30117
- Jakubowski H (2000) Translational incorporation of S-nitrosohomocysteine into protein, J Biol Chem 275(29):21813–21816
- Jakubowski H, Ambrosius WT, Pratt JH (2001) Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis. FEBS Lett 491(1–2):35–39
- Garin MC, James RW, Dussoix P et al (1997) Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. J Clin Invest 99(1):62–66
- Vallance P, Leiper J (2004) Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(6):1023–1030
- Dayal S, Rodionov RN, Arning E et al (2008) Tissue-specific downregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase in hyperhomocysteinemia. Am J Physiol Heart Circ Physiol 295(2): H816–H825
- Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM (2000) Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. Genomics 68(1):101–105
- Zhang JG, Liu JX, Li ZH, Wang LZ, Jiang YD, Wang SR (2007) Dysfunction of endothelial NO system originated from homocysteine-induced aberrant methylation pattern in promoter region of DDAH2 gene. Chin Med J (Engl) 120(23):2132–2137
- Chan GC, Fish JE, Mawji IA, Leung DD, Rachlis AC, Marsden PA (2005) Epigenetic basis for the transcriptional hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene in vascular endothelial cells. J Immunol 175(6):3846–3861
- Perna AF, Satta E, Acanfora F, Lombardi C, Ingrosso D, De Santo NG (2006) Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients. Kidney Int 69(5):869–876
- Frosst P, Blom HJ, Milos R et al (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase [letter]. Nat Genet 10(1):111–113.

- Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N (1991) Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. Am J Hum Genet 48(3):536–545
- Fish JE, Matouk CC, Rachlis A et al (2005) The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. J Biol Chem 280(26):24824–24838
- Christoph F, Weikert S, Kempkensteffen C et al (2006) Promoter hypermethylation profile of kidney cancer with new proapoptotic p53 target genes and clinical implications. Clin Cancer Res 12(17):5040–5046
- Kristensen LS, Wojdacz TK, Thestrup BB, Wiuf C, Hager H, Hansen LL (2009) Quality assessment of DNA derived from up to 30 years old formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue for PCR-based methylation analysis using SMART-MSP and MS-HRM. BMC Cancer 9:453
- Weisenberger DJ, Campan M, Long Tl et al (2005) Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. Nucleic Acids Res 33(21):6823-6836
- Antoniades C, Shirodaria C, Lœson P et al (2009) MTHFR 677
 C>T Polymorphism reveals functional importance for 5-methyltetrahydrofolate, not homocysteine, in regulation of vascular redox state and endothelial function in human atherosclerosis. Circulation 119(18):2507–2515
- Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP (2001) Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. Circulation 104(21):2569–2575
- Hu X, Atzler D, Xu X et al (2011) Dimethylarginine dimethylarminohydrolase-1 is the critical enzyme for degrading the

- cardiovascular risk factor asymmetrical dimethylarginine. Arterioscler Thromb Vasc Biol 31(7):1540-1546
- Sohn KJ, Jang H, Campan M et al (2009) The methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation induces cell-specific changes in genomic DNA methylation and uracil misincorporation: a possible molecular basis for the site-specific cancer risk modification. Int J Cancer 124(9):1999–2005
- Yu Z, Kone BC (2004) Hypermethylation of the inducible nitricoxide synthase gene promoter inhibits its transcription. J Biol Chem 279(45):46954–46961
- Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW (2001) Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. Circulation 103(22):2717–2723
- Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE et al (2003) Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. Circulation 108(8):933–938
- Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, Goligorsky MS (2000) Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. Am J Physiol Renal Physiol 279(4):F671–F678
- Sass JO, Nakanishi T, Sato T, Sperl W, Shimizu A (2003) S-homocysteinylation of transthyretin is detected in plasma and serum of humans with different types of hyperhomocysteinemia. Biochem Biophys Res Commun 310:242–246
- Zinellu A, Zinellu E, Sotgia S, Formato M, Cherchi GM, Deiana L, Carru C (2006) Factors affecting S-homocysteinylation of LDL apoprotein B. Clin Chem 52:2054–2059



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Osler W. The principles and practice of medicine, designed for the use of practitioners and students of medicine. 1892. New York: D. Appleton and Company.
- 2. Childs B. Genetic medicine: a logic of disease. 1999. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- 3. Dover GJ. The Barker Hypothesis: How Pediatricans Will Diagnose And Prevent Common Adult-Onset. *Transactions American of the Clinical and Climatological Association*. 2009;120:199-207.
- 4. World Health Organization (WHO 2013). Cardiovascular diseases (CVDs). Fact sheet N°317. Updated March 2013. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/.
- 5. Danchin N, Puymirat E. 1980-2010: the Three Glorious Decades of Cardiology. A Comprehensive and Collective Effort Rewarded by Outstanding Clinical Results. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64(11):959-961.
- 6. Majesky MW. Vascular smooth muscle diversity: insights from developmental biology. *Curr Atheroscler Rep.* 2003;5:208-213.
- 7. Archacki SR, Angheloiu G, Moravec CS, Liu H, Topol EJ, Wang QK. Comparative gene expression analysis between coronary arteries and internal mammary arteries identifies a role for the TES gene in endothelial cell functions relevant to coronary artery disease. *Hum Mol Genet*. 2012;21(6):1364-1373.
- 8. Tabata M, Grab JD, Khalpey Z, Edwards FH, O'Brien SM, *et al.* Prevalence and variability of internal mammary artery graft use in contemporary multivessel coronary artery bypass graft surgery: analysis of the Society of Thoracic Surgeons National Cardiac Database. *Circulation*. 2009;120(11):935-940.
- 9. Cameron A, Davis KB, Green G, Schaff HV. Coronary bypass surgery with internal-thoracic-artery grafts-effects on survival over a 15-year period. *N Engl J Med.* 1996;334(4):216-219.
- 10. Lytle BW, Blackstone EH, Sabik JF, Houghtalling P, Loop FD, Cosgrove DM. The effect of bilateral internal thoracic artery grafting on survival during 20 postoperative years. *Ann Thorac Surg.* 2004;78:2005-2012.
- 11. Rankin JS, Tuttle RH, Wechsler AS, Teichmann TL, Glower DD, Califf RM. Techniques and benefits of multiple internal mammary artery bypass at 20-year of follow up. *Ann Thorac Surg.* 2007;83:1008-1014.
- 12. Zulli A, Hare DL, Horrigan M, Buxton BF. The Resistance of the IMA to Atherosclerosis Might Be Associated With It Higher eNOS, ACE and ET-A Receptor Immunoreactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23;1308.
- 13. Anderson JL, Muhlestein JB, Horne BD, Carlquist JF, Bair TL, *et al.* Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Circulation*. 2000;102(11):1227-1232.
- 14. Tanaka T, Scheet P, Giusti B, Bandinelli S, Piras MG, et al. Genome-wide association study of vitamin B_{12} , folate, and homocysteine blood concentrations. Am J Hum Genet. 2009;84(4):477-482.
- 15. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(6):H2649-H2656.
- 16. James SJ, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Caudill MA. Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J Nutr.* 2002;132(8 Suppl):2361S-2366S.
- 17. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J.* 1999;13(15):2277-2283.

- 18. Sengupta S, Chen H, Togawa T, DiBello PM, Majors AK, *et al.* Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine. *J Biol Chem.* 2001;276(32):30111-30117.
- 19. Jakubowski H. Translational incorporation of S-nitrosohomocysteine into protein. *J Biol Chem.* 2000; 275(29):21813-21816.
- 20. Jakubowski H, Ambrosius WT, Pratt JH. Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis. *FEBS Lett.* 2001;491(1-2):35-39.
- 21. Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanché H, Passa P, *et al.* Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest.* 1997;99(1):62-66.
- 22. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(6):1023-1030.
- 23. Dayal S, Rodionov RN, Arning E, Bottiglieri T, Kimoto M, *et al.* Tissue-specific downregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase in hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(2):H816-H825.
- 24. Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics*. 2000;68(1):101-105.
- 25. Zhang JG, Liu JX, Li ZH, Wang LZ, Jiang YD, Wang SR. Dysfunction of endothelial NO system originated from homocysteine-induced aberrant methylation pattern in promoter region of DDAH2 gene. *Chin Med J (Engl)*. 2007;120(23):2132-2137.
- 26. William B, Kannel MD, McGree D, Gordon T. A general cardiovascular risk profile: The Framingham Study. *Am J Cardiol.* 1976;38:46-51.
- 27. Mathers CD, Loncar D. Updated projections of global mortality and burden of disease, 2002-2030: data sources, methods and results. Geneva, *World Health Organization*. 2005. WHO Library.
- 28. Nichols M, Townsend N, Luengo R, Leal J, Gray A, *et al.* European Cardiovascular. Disease Statistics 2012. European Heart Network, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis. http://www.ehnheart.org/cvd-statistics.html.
- 29. Alfonso F, Segovia J, Heras M, Bermejo J. Cardiovascular Prevention: Always Too Late?. Rev Esp Cardiol.2008;61(3):291-298.
- 30. Plos Medicine. Affluence and the Worldwide Distribution of Cardiovascular Disease Risks. *PLoS Med.* 2005;2(5):e148.
- 31. Shishehbor MH, Oliveira LP, Lauer MS, Sprecher DL, Wolski K, *et al.* Emerging cardiovascular risk factors that account for a significant portion of attributable mortality risk in chronic kidney disease. *Am J Cardiol.* 2008;101:1741-1746.
- 32. Kotseva K. Global preventive policies. Strategies at European and worldwide level. *Rev Esp Cardiol.* 2008;61(9):960-970.
- 33. *The Victoria Declaration:* On Heart Health. Declaration of the Advisory Board of the International Heart Health Conference. 1992. Victoria, British Columbia. Canadá.
- 34. The Luxemburgo Declaration. http://www.ptkardio.pl/files//file/luxembourgdeclarationfinal.pdf.
- 35. The European Heart Health Charter. http://www.heartcharter.eu/.
- 36. Lloyd-Jones DM. AHA creates new metric of CV health to reach 2020 Impact Goal. *Circulation*. 2010;121:586-613.
- 37. Smith SC Jr, Collins A, Ferrari R, Holmes DR Jr, Logstrup S, *et al.* Our Time: A Call to Save Preventable Death From Cardiovascular Disease (Heart Disease and Stroke). *Circulation*. 2012;126(23):2769-2775.

- 38. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD. On behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. AHA Statistical Update. Heart Disease and Stroke Statistics-2013 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2013;127:e6-e245.
- 39. Grau M, Marrugat J. Risk functions and the primary prevention of cardiovascular disease. *Rev Esp Cardiol.* 2008;61(4):404-416.
- 40. Instituto Nacional de Estadística (INE). Proyecciones de Población a Largo Plazo, 2009-2049. Nota de Prensa de 28 de enero de 2010. http://www.ine.es/prensa/prensa.htm e INEbase-www.ine.es.
- 41. Instituto Nacional de Estadística (INE). Defunciones según la Causa de Muerte. Año 2011. Nota de Prensa de 27 de febrero de 2013. INEbase-www.ine.es. Notas de prensa: www.ine.es/prensa/prensa.htm.
- 42. Grau M, Elosua R, Cabrera A, Guembe MJ, Baena JM, *et al.* Cardiovascular risk factors in Spain in the first decade of the 21st Century, a pooled analysis with individual data from 11 population-based studies: the DARIOS study. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64(4):295-304.
- 43. Heistad DD. Oxidative Stress and Vascular Disease. 2005 Duff Memorial Lecture. Brief Review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:689-695.
- 44. Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. N Engl J Med. 1999;340(2):115-126.
- 45. Armstrong ML, Warner E, Connor W. Regression of coronary atheromatosis in rhesus monkeys. *Cir Res.* 1970;27:59-67.
- 46. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. National Cholesterol Education Program: Second report of the expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol (Adult Treatment Panel II), Bethesda, Md: National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute; 1993: NIH Publication N° 93-3095.
- 47. Páramo JA, Lecumberri R, Orbe J. Arterial thrombosis and genetic polymorphisms: too many actors, complex. *Med Clin (Barc)*. 2005;124(2):69-74.
- 48. Navarro F. Genes and coronary heart disease. Rev Esp Cardiol. 2002;55:413-431.
- 49. Hatchwell E, Greally JM. The potential role of epigenomic dysregulation in complex human disease. *Trends Genet.* 2007;23(11):588-595.
- 50. Coccheri S. On behalf of the CAPRIE Investigators. Distribution of symptomatic atherothrombosis and influence of atherosclerotic disease burden on risk of secondary ischaemic events: results from CAPRIE study. *Eur Heart J.* 1998;19(Suppl):1268.
- 51. Ray KK, Seshasai SRK, Erqou S, Sever P, Jukema JW, *et al.* Statins and All-Cause Mortality in High-Risk Primary Prevention. A meta-analysis of 11 Randomized Controlled Trials Involving 65.229 Participants. *Arch Intern Med.* 2010;170(12):1024-1031.
- 52. Badimón JJ, Ibáñez B. Increasing High-Density Lipoprotein as a Therapeutic Target in Atherothrombotic Disease. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63(3):323-333.
- 53. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285:2486-2497.
- 54. Companioni O, Rodríguez F, Medina A, Rodríguez JC. Genetic variants, cardiovascular risk and genome-wide association studies. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64(6):509-514.
- 55. Tuomisto TT, Binder BR, Ylä-Herttuala S. Genetics, genomics and proteomics in atherosclerosis research. *Ann Med.* 2005;37:323-332.
- 56. Van der Greef J, Stroobant P, Van der Heijden R. The role of analytical sciences in medical sistems biology. *Curr Opin Chem Biol.* 2004;8:559-565.

- 57. Peter J, Archer T, Baylin S, Beck S, Berg S, *et al.* Moving AHEAD with an international human epigenome project. A plan to "genomicize" research and pave the way for breakthroughs in the prevention, diagnosis and treatment of human disease. The American Association for Cancer Research Human Epigenome Task Force and the European Union, Network of Excellence, Scientific Advisory Board. *Nature*. 2008;454:711-715.
- 58. NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium. http://www.roadmapepigenomics.org/.
- 59. Halusková J. Epigenetic Studies in Human Diseases. Review Article. Folia Biologica (Praha). 2010;56:83-96.
- 60. Slatkin M. Epigenetic Inheritance and the Missing Heritability Problem. Genetics. 2009;182:845-850.
- 61. Lim SJ, Tan TW, Tong JC. Computacional Epigenetics: the new scientific paradigm. *Bioinformation*. 2010;4(7):331-337.
- 62. Shreenivasaiah PK, Rho S-H, Kim T, Kim DH. An overview of cardiac systems biology. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44:460-469.
- 63. Graham I, Atar D, Borch K, Boysen G, Burell G, *et al.* European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: Fourth Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur J Cardiovasc Prev Rehab.* 2007;14(Suppl 2):S1-S113.
- 64. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, *et al.* European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Rev Esp Cardiol.* 2012;65(10):937.e1-e66.
- 65. Hlatky MA, Greenland P, Arnett DK, Ballantyne C, Criqui MH. On behalf of the American Heart Association Expert Panel on Subclinical Atherosclerotic Diseases and Emerging Risk Factors and the Stroke Council. *Circulation*. 2009;119:2408-2416.
- 66. Friedman GD, Klastsky AL, Siegelaub AB. The leukocytes count as a predictor of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1974;290:1275-1278.
- 67. Bevilacqua MP. Endothelial leukocyte adhesion molecules. Annu Rev Immunol. 1993;11:767-804.
- 68. Heltianu C, Costache G, Gafencu A, Diaconu M, Bodeanu M, et al. Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endothelial cell dysfunction. *J Cell Mol Med*. 2005;9:135-142.
- 69. Madamanchi NR, Zhou RH, Vendrov AE, Niu XL, Runge MS. Does oxidative DNA Damage Cause Atherosclerosis and Metabolic Syndrome? New Insights Into Which Came First: The Chicken or The Egg. *Circ Res.* 2010;107.940-942.
- 70. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, *et al.* Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res.* 2000;41:1481-1494.
- 71. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, *et. al.* Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res.* 2000;41:1495-1508.
- 72. 407. Rodríguez F, Hernández Y, Macías A, Hernández E, Medina A, Rodríguez JC. Concerning the Significance of Paraoxonase-1 and *SR-B1* Genes in Atherosclerosis. *Rev Esp Cardiol.* 2006;59:154-64.
- 73. Sharma P, Senthilkumar RD, Brahmachari V, Sundaramoorthy E, Mahajan A, *et al.* Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids Health Dis.* 2006;5(1):1-19.
- 74. Yang Z, Ming XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res.* 2006;4:53-65.
- 75. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation. 2004;109:III27-III32.

- 76. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules part I. N Engl J Med. 1996;334:1526-1529.
- 77. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules part II: Blood vessels and blood cells. *N Engl J Med.* 1996;335;43-45.
- 78. Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:129-156.
- 79. Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Page S, et al. Dysregulation of monocytic nuclear factor Kappa B by oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1901-1909.
- 80. Bourcier T, Sukhova G, Libby P. The nuclear factor- kB signalling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J Biol Chem.* 1997;272:15617-15824.
- 81. Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1702-1711.
- 82. Llorente V, Martínezz J, Badimón L. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1572-1579.
- 83. Kalsotra A, Cooper TA. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. Review. *Nat Rev Genet.* 2011;12(10):715-729.
- 84. Singh RK, Cooper TA. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. Review. *Trends Mol Med.* 2012;18(8):472-482.
- 85. Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 2002;417:750-754.
- 86. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 2004:95:764-772.
- 87. Mineo C, Shaul PW. HDL Stimulation of endothelial nitric oxide sinthase: a novel mechanism of HDL action. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13:226-231.
- 88. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res.* 2005;46:1239-1247.
- 89. Macharia M, Hassan MS, Blackhurst D, Erasmus RT, Matsha TE. The growing importance of PON1 in cardiovascular health: a review. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2012;13(7):443-53.
- 90. Costa LG, Cole TB, Furlong CE. Paraoxonase (PON1): from toxicology to cardiovascular medicine. *Acta Biomed.* 2005;(Suppl 2):50-57.
- 91. Mackness B, Turkie W, Mackness M. Paraoxonase-1 (PON1) promoter region polymorphisms, serum PON1 status and coronary heart disease. *Arch Med Sci.* 2013;9(1):8-13.
- 92. Litvinov D, Mahini H, Garelnabi MN. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. *Am J Med Sci.* 2012;4(11):523-532.
- 93. Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem.* 2003;278:3937-3947.
- 94. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 1998;101:1581-1590.
- 95. Heinecke JW, Lusis AJ. Paraoxonase-gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis?. *Am J Hum Genet.* 1998;62:20-24.

- 96. Ribas V, Sanchez JL, Anton R, Camacho M, Julve J, *et al.* Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ Res.* 2004;95:789-797.
- 97. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333(6174):664-666.
- 98. Berrazueta JR. The Nobel Prize for nitric oxide. The unjust exclusion of Dr. Salvador Moncada. *Rev Esp Cardiol.* 1999;52:221-226.
- 99. Albrecht E, Stegeman C, Heeringa P, Henning R, van Goor H. Protective role of endotelial nitric oxide synthase. Review Article. *J Pathol.* 2003;199:8-17.
- 100. Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Byophys Res Commun.* 1994;198:1027-1033.
- 101. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, *et al.* Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993;268:17478-17488.
- 102. Jeerooburkhan N, Jones L, Bujac S, Cooper J, Miller G, *et al.* Genetic and Environmental Determinants of Plasma Nitrogen Oxides and Risk of Ischemic Heart Disease. *Hypertension*. 2001;38:1054-1061.
- 103. Antoniades C, Bakogiannis C, Leeson P, Guzik TJ, Zhang MH. Rapid, Direct Effects of Statin Treatment on Arterial Redox State and Nitric Oxide. Bioavailability in Human Atherosclerosis via Tetrahydrobiopterin-Mediated Endothelial Nitric Oxide Synthase Coupling. *Circulation*. 2011;124:335-345.
- 104. Brown K, Kluijtmans L, Young I, Woodside J, Yarnell WJ, et al. Genetic Evidence That Nitric Oxide Modulates Homocysteine. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23:1014-1020.
- 105. O'Donnell C, Elosua R. Cardiovascular risk factors. Insights from Framingham Heart Study. Rev Esp Cardiol. 2008;61(3):299-310.
- 106. Jaramillo NI. Factores de Riesgo Cardiovascular. Mitos y Realidades. 2007. Clínica Las Américas. Medellín: L. Vieco Ltda.
- 107. Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA*. 2003;290:932-940.
- 108. Myers GL, Christenson RH, Cushman M, Ballantyne CM, Cooper GR, *et al.* National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice guidelines (NACB 2009): emerging biomarkers for primary prevention of cardiovascular disease. *Clin Chem.* 2009;55:378-384.
- 109. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of Creactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA*. 2001;285:2481-2485.
- 110. Shelhub J. Public health significance of elevated homocysteine. *Food and Nutrition Bulletin*. 2008;29(Suppl 2):116-125.
- 111. O'Toole TE, Hellmann J, Wheat L, Haberzettl P, Lee J, et al. Episodic exposure to fine particulate air pollution decreases circulating levels of endothelial progenitor cells. *Circ Res.* 2010;107:200-203.
- 112. Canto JG, Iskandrian AE. Major risk factors for cardiovascular disease: debunking the "only 50%" myth. JAMA. 2003;290:947-949.
- 113. Marrugat J, Subirana I, Comin E, Cabezas C, Vila J, *et al.* Validity of an adaptation of the Framingham cardiovascular risk function: the VERIFICA Study. *J Epidemiol Community Health.* 2007;61:40-47.
- 114. Santos CG, Badimón JJ High-Density Lipoprotein and Cardiovascular Risk Reduction: Promises and Realities. *Rev Esp Cardiol.* 2012;65(4):305-308.

- 115. Yusuf S, Hawken T, Ounpuu S, Dans S, Avezun A, *et al.* Effect of potencially modificable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004;364(9438):937-952.
- 116. Sing CF, Stengard JH, Kardia SLR. Genes, Environment, and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1190-1196.
- 117. Elousa R, Lluís GC, Lucas G. Research In to the Genetic Component of Heart Disease: From Linkage Studies to Genome-Wide Genotyping. *Rev Esp Cardiol.* 2009;9(Suppl B):B24-38.
- 118. Lluís GC, Lucas G, Subirana I, Sentí M, Jiménez J, et al. Additive effect of multiple genetic variants on the risk of coronary artery disease. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63(8):925-933.
- 119. Smith PJ, Blumenthal JA. Psychiatric and behavioral aspects of cardiovascular disease: epidemiology, mechanisms, and treatment. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64(10):924-933.
- 120. Teo K, Chow CK, Vaz M, Rangarajan S, Yusuf S. The Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) study: Examining the impact of societal influences on chronic noncommunicable diseases in low, middle, and high-income countries. The PURE Investigators-Writing group Hamilton, Ontario, Canada; and Bangalore, India. *Am Heart J.* 2009;158(1):1-7.
- 121. http://www.escardio.org/congresses/esc-2012/congress-reports/Pages/709-1-PURE.aspx.
- 122. Gerszten RE and Wang TJ. The search for new cardiovascular biomarkers. Nature. 2008;451:949-952.
- 123. Humphries SE, Drenos F, Ken-Dror G, Talmud PJ. Coronary Heart Disease Risk Prediction in the Era of Genome-Wide Association Studies. Current Status and What the Future Holds. *Circulation*. 2010;121:2235-2248.
- 124. Roberts R. Genome-Wide Association Studies-Do Not Judge a Book by Its Cover. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63(8):890-892.
- 125. Clarke R, Peden JF, Hopewell JC, Kyriakou T, Goel A, et al. Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease. N Engl J Med. 2009;361:2518-2528.
- 126. Regieli JJ, Jukema JW, Doevendans PA, Zwinderman AH, Kastelein JJ, *et al.* Paraoxonase variants relate to 10-year risk in coronary artery disease: impact of a high-density lipoprotein-bound antioxidant in secondary prevention. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:1238-1245.
- 127. Morrison JA, Friedman LA, Gray-McGuire C. Metabolic syndrome in childhood predicts adult cardiovascular disease 25 years later: the Princeton Lipid Research Clinics Follow-up Study. *Pediatrics*. 2007;120:340-345.
- 128. Healy G, Owen N. Sedentary Behaviour and Biomarkers of Cardiometabolic Health Risk in Adolescents: An Emerging Scientific and Public Health Issue. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63(3):261-264.
- 129. Morrison K, Atkinson S, Yusuf S, Bourgeois J, McDonald S, *et al.* The Family Atherosclerosis Monitoring In earLY life (FAMILY) study: Rationale, design, and baseline data of a study examining the early determinants of atherosclerosis. The FAMILY investigators Ontario, Canada. *Am Heart J.* 2009;158(4):535-539.
- 130. Dunger DB, Salgin B, Ong KK. Session 7: early nutrition and later health. Early developmental pathways of obesity and diabetes risk. *Proc Nutr Soc.* 2007;66:451-457.
- 131. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med.* 1998;338:1650-1656.
- 132. Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D'Armiento FP, Palinski W. Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet.* 1999;354:1234-1241.

- 133. Pons D, de Vries F, van den Elsen P, HijmansB, Quax P, Jukema W. Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodeling: new targets for the therapy in cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2009;30:266-277.
- 134. Allis D, Elgin S, Jones P, Martienssen R, Pirrotta V, Rine J, Wu C. Scientific Advisory Board. International support for the Epigenome network. Epigenetic? *The Epigenome Network of Excellence*. 2006. www.epigenome.eu/www.epigenome-noe.net/ © Copyright Epigenome NoE. Website Design and development by Tom Davis Design, London in partnership with the Epigenome NoE. Contents: Editor, Writer, Picture researcher, Webmaster Brona McVittie.
- 135. Barker DJ. Fetal programming of coronary heart disease. Trends Endocrinol Metab. 2002;13(9):364-368.
- 136. Alkemade E, Gittenberger-de Groot E, Schiel C, VanMunsteren B, Hogers S, *et al.* Intrauterine exposure to maternal atherosclerotic risk factors increases the susceptibility to atherosclerosis in adult life. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2228-2235.
- 137. Reilly JJ, Armstrong J, Dorosty AR, Emmett PM, Ness A, *et al.* Early life risk factors for obesity in childhood: cohort study. *BMJ*. 2005;330(7504):1357-1364.
- 138. Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*. 2000;21:461-467.
- 139. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD. DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res.* 2008;647(1-2):30-38.
- 140. Robertson KD. DNA methylation and human disease. Nature Rev Genet. 2005;6:597-610.
- 141. Talens RP, Boomsa DI, Tobi EW, Kremer D, Jukema JW, et al. Variation, patterns and temporal stability of DNA methylation: considerations for epigenetic epidemiology. FASEB J. 2010;9:3135-3144.
- 142. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 1969;56:111-128.
- 143. Wilcken DE, Wilcken B. The patogénesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest*. 1976;57:1079-1082.
- 144. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2001;104(21):2569-2575.
- 145. Maron BA, Loscalzo J. The Treatment of Hyperhomocysteinemia. Annu Rev Med. 2009;60:39-54.
- 146. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59 (Suppl 9):155-167.
- 147. Welch GN, Upchurch GR Jr, Farivar RS, Pigazzi A, Vu K, *et al.* Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular-smooth muscle cells by NF-kB-dependent transcriptional activation of Nos2. *Proc Assoc Am Physiol.* 1998;110:22-31.
- 148. Jakubowski H. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr.* 2000;130(2S Suppl):377S-381S.
- 149. Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004;61:470-487.
- 150. Antoniades C, Antonopoulos A, Tousoulis D, Marinou K, Stefanadis C. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials. *Eur Heart J.* 2009;30:6-15.
- 151. Ingrosso D, Perna A. Epigenetics in hyperhomocysteinemic states. A special focus on uremia. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009;1790:892-899.
- 152. Lentz SR. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1646-1654.

- 153. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of the randomized trials. *Am J Clin Nutr.* 2005;82:806-812.
- 154. Akhtar N. Is homocysteine a risk factor for atherothrombotic cardiovascular disease?. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:1370-1371.
- 155. Marcus J, Sarnak MJ, Menon V. Homocysteine lowering and cardiovascular disease risk: lost in translation. *Can J Cardiol.* 2007;23(9):707-710.
- 156. Kaul S, Zadeh AA, Shah PK. Homocysteine hypothesis for atherothrombotic cardiovascular disease: Not validated. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:914-923.
- 157 (152). Wang X, Qin X, Demirtas H, Li J, Mao G, *et al.* Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *Lancet.* 2007;369:1876-1882.
- 158. B-Vitamin Treatment Trialists' Collaboration. Homocysteine-lowering trials for prevention of cardiovascular events: a review of the design and power of the large randomized trials. *Am Heart J.* 2006;151:282-287.
- 159. Yang Q, Botto LD, Erickson JD, Berry RJ, Sambell C, et al. Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002. *Circulation*. 2006;113:1335-1343.
- 160. Bonaa KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. N Engl J Med. 2006;354:1578-1588.
- 161. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, *et al.* Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med.* 2006;354:1567-1577.
- 162. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LC, *et al.* Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291:565-575.
- 163. Armitage JM, Bowman L, Clarke R, Wallendszus K, Bulbulia R, *et al.* Study of the Effectiveness of Adittional Reductions in Cholesterol and Homocysteine (SEARCH) Collaborative Group. Effects of Homocysteine-Lowering With Folic Acid Plus Vitamin B12 vs Placebo on Mortality and Majo Morbidity in myocardial Infarction survivors. A Randomized Trial. *JAMA*. 2010;303(24):2486-2494.
- 164. Galan P, Kesse-Guyot E, Czernichow S, Briancon S, Blacher J, Hercberg S. Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular diseases: a randomized placebo controlled trial. *BMJ.* 2010;341:c6273-c6282.
- 165. VITATOPS Trial Study Group. B vitamins in patients with recent transient ischaemic attack or stroke in the VITAmins TO Prevent Stroke (VITATOPS) trial: a randomised, double-blind, parallel, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2010;9:855-865.
- 166. Wagner C, Koury MJ. S-Adenosylhomocysteine a better indicator of vascular disease than Homocysteine?. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:1581-1585.
- 167. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1985;37:1-31.
- 168. 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;274:1049-1057.
- 169. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. N Engl J Med. 1998;338:1042-1050.
- 170. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA*. 2002;288:2015-2022.

- 171. Clarke R, Lewington S, Sherliker P, Armitage J. Effects of B-vitamins on plasma homocysteine concentrations and on risk of cardiovascular disease and dementia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10:32-39.
- 172. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* .2002;325(1202):1-7.
- 173. Nevado JB Jr, Imasa MS. Homocysteine predicts adverse clinical outcomes in unstable angina and non-ST elevation myocardial infarction: implications from the folate intervention in non-ST elevation myocardial infarction and unstable angina study. *Coron Artery Dis.* 2008;19:153-161.
- 174. Vizzardi E, Nodari S, Fiorina C, Metra M, Dei Cas L. Plasma homocysteine levels and late outcome in patients with unstable angina. *Cardiology*. 2007;107:354-359.
- 175. Bełtowski J. Protein homocysteinylation: a new mechanism of atherogenesis? *Postepy Hig Med Dosw (online)*. 2005;59:392-404.
- 176. Mazza G. Glutathione and the sulfur-containing aminoacids: An overview. Chapter 1. En: Glutathione and sulfur amino acids in human health and disease. 2009. Edited By Masella R, Brosnan JT, Brosnan ME. John Wiley & Sons, Inc. Pags 3-16.
- 177. Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:3227-3245.
- 178. Gariboto G, Valli A, Anderstam B, Eriksson M, Suliman M, *et al.* The kidney is the major site of S-adenosylhomocisteine disposal in humans. *Kidney Int.* 2009;76:293-296.
- 179. Frosst P, BlomHJ, Milos R, Goyyete P, Sheppard CA, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet. 1995;10:111-113.
- 180. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, *et al.* Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. Young award winner. *J Med Genet.* 2003;40:619-625.
- 181. Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalisyn J, Strokosh G. Intermediate homocysteinemia: A Thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Human Genet.* 1988;43:414-421.
- 182. Kang SS, Passen EL, Ruggie N, Wong PWK, Sora H. Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation*. 1993;88:1463-1469.
- 183. Jaques PF, Boston AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, *et al.* Relation between float status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation.* 1996;93:7-9.
- 184. Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:13217-13220.
- 185. Kluijtmans LAJ, Whitehead AS. Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes and predisposition to atherothrombotic disease. Evidence that all three MTHFR C677T genotypes confer different levels of risk. *Eur Heart J.* 2001;22:294-299.
- 186. Miyaki K. Genetic Polymorphisms in Homocysteine Metabolism and Response to Folate Intake: A Comprehensive Strategy to Elucidate Useful Genetic Information. Young Investigator Award Winner's Special Article. *J Epidemiol.* 2010;20(4):266-270.
- 187. Lange LA, Croteau-Chonka DC, Marvelle AF, Qin L, Gaulton KJ, et al. Genome-wide association study of homocysteine levels in Filipinos provides evidence for CPS1 in women and a stronger MTHFR effect in young adults. *Hum Mol Genet*. 2010;19(10):2050-2058.

- 188. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinaemia in an elderly population. *JAMA*. 1993;270:2693-2698.
- 189. Mager A, Battler A, Birnbaum Y, Magal N, Mordechai S. Plasma Homocysteine, Methylenetetrahydrofolate Reductase Genotypes, and Age at Onset of Symptoms of Myocardial Ischemia. *Am J Cardiol.* 2002;89:919-923.
- 190. Chal AU, Abrams J. Homocysteine: a new cardiac risk factor?. Clin Cardiol. 2001;24(1):80-84.
- 191. Higdon JV, Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. Crit Rev Food Sci Nutr. 2006;46:101-123.
- 192. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults: The ATTICA Study. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:152-158.
- 193. Vermeulen EG, Stehouwer CD, Twisk JW, van den Berg M, de Jong SC, *et al.* Effect of homocysteine lowering treatment with folic acid plus vitamin B6 on progression of subclinical atherosclerosis: a randomized, placebo controlled trial. *Lancet.* 2000;355:517-522.
- 194. Dong C, YoonW, Goldschmidt-Clermont PJ. DNA methylation and atherosclerosis. *J Nutr.* 2002;132:2406S-2409S.
- 195. Gallou-Kabani C, Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic. *Diabetes*. 2005;54:1899-1906.
- 196. Castro R, Rivera I, Martins C, Struys EA, Jansen EE, *et al.* Intracellular S-adenosylhomocysteine increased levels are associated with DNA hypomethylation in HUVEC. *J Mol Med.* 2005;83:831-836.
- 197. Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, *et al.* A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:5606-5611.
- 198. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, *et al.* Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile: the Hordaland Homocysteine Study. *JAMA*. 1995;274:1526-1533.
- 199. Title LM, Cummings PM, Giddens K, Genest JJ Jr, Nassar BA. Effect of folid acic and antioxidant vitamins on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:758-765.
- 200. McLean E, de Benoist B, Allen LH. Review of the magnitude of folate and vitamin B12 deficiencies worldwide. *Food Nutr Bull.* 2008;29(Suppl 2):S38-51.
- 201. Chen CP. Syndromes, disorders and maternal risk factors associated with neural tube defects (IV). *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2008;47:141-150.
- 202. Zhu BT. Medical hypothesis: hyperhomocysteinemia is a risk factor for estrogen-induced hormonal cancer. *Int J Oncol.* 2003;22(3):499-508.
- 203. Martínez ML. The biochemical structure and function of methylenetetrahydrofolate reductase provide the rationale to interpret the epidemiological results on the risk for infants with Down syndrome. *Am J Med Genet A*. 2008;146A:1477-1482.
- 204. Roblin X, Paris F, Pellissier L, Le Gall S, Boudemaghe T. Influence of lipid-lowering drugs on homocysteine levels. *Rev Med Interne*. 2002;23(8):735-736.
- 205. Musarrat K, Kalathil D, Varughese GI. Metformin, B₁₂ and homocysteine levels: the plausible cause or effect?. *J Formos Med Assoc.* 2008;107:505-506.
- 206. Poduri A, Kaur J, Thakur JS, Kumari S, Jain S, Khullar M. Effect of ACE inhibitors and beta-blockers on homocysteine levels in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2008;22:289-294.

- 207. Ermens AA, Schoester M, Lindemans J, Abels J. Effect of nitrous oxide and methotrexate on folate coenzyme pools of blast cells from leukemia patients. *Leuk Res.* 1991;15:165-171.
- 208. Antoniades C, Shirodaria C, Leeson P, Antonopoulos A, Warrick N, *et al.* Association of plasma asymetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endotelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2009;30:1142-1150.
- 209. Moens AL, Claeys MJ, Wuyts FL, Goovaerts I, Van Hertbruggen, et al. Effect of folic acid on endothelial function following acute myocardial infarction. Am J Cardiol. 2007;99:476-481.
- 210. Lange H, Suryapranata H, De Luca G, Borner C, Dille J, et. al. Folate therapy and in-stent restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med.* 2004;350:2673-2681.
- 211. Martí A, Solà I, Lathyris D, Salanti G. Homocysteine lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;(4):CD006612. Updated in: Martí AJ, Solà I, Lathyris D, Karakitsiou D, Simancas RD. Homocysteine □lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(1):CD006612.
- 212. Jardine MJ, Kang A, Zoungas S, Navaneethan SD, Ninomiya T, *et al.* The effect of folic acid based homocysteine lowering on cardiovascular events in people with kidney disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2012;344:e3533 (1-11).
- 213. Ebbing M, Bleie Ø, Ueland PM, Nordrehaug JE, Nilsen DW, *et al.* Mortality and cardiovascular events in patients treated with homocysteine-lowering B vitamins after coronary angiography: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2008;300:795-804.
- 214. Jakubowski H, Zhang L, Bardeguez A, Aviv A. Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Circ Res.* 2000;87:45-51.
- 215. Jakubowski H. Anti-N-homocysteinylated protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43:1011-1014.
- 216. Undas A, Stepien E, Glowacki R, Tisonczyk J, Tracz W, Jakubowski H. Folic acid administration and antibodies against homocysteinylated proteins in subjects with hyperhomocysteinemia. *Thromb Haemos*. 2006;96:342-347.
- 217. Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J Biol Chem.* 1997;272:1935-1942.
- 218. Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem.* 2000;275:3957-3962.
- 219. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, et al. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20:2441-2447.
- 220. Domagala TB, Lacinski M, Trzeciak WH, Mackness B, Mackness MI, Jakubowski H. The correlation of homocysteine-thiolactonase activity of the paraoxonase (PON1) protein with coronary heart disease status. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2006;52:4-10.
- 221. Lacinski M, Skorupski W, Cieslinski A, Sokolowska J, Trzeciak WH, Jakubowski H. Determinants of homocysteine-thiolactonase activity of the paraoxonase-1 (PON1) protein in humans. *Cell Mol Biol (Noisy-legrand)*. 2004;50:885-893.
- 222. Zimny J, Sikora M, Guranowski A, Jakubowski H. Protective mechanisms against homocysteine toxicity: the role of bleomycin hydrolase. *J Biol Chem.* 2006;281:22485-22492.
- 223. Davis KA, Crow JA, Chambers HW, Meek EC, Chambers JE. Racial Differences in Paraoxonase-1 (PON1): A Factor in the Health of Southerners?. *Research*. 2009;117(8):1226-1231.

- 224. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, *et al.* Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11:412-419.
- 225. Jarvik JP, Jampsa R, Richter RJ, Carlson CS, Rieder MJ, *et al.* Novel paraoxonase (PON1) nonsense and missense mutations predicted by functional genomic assay of PON1 status. *Pharmacogenetics*. 2003;13:291-295.
- 226. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett.* 1998;423:57-60.
- 227. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, *et al.* Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995;96:2882-2891.
- 228. Humbert R, Adler DA, Disteche CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet.* 1993;3:73-76.
- 229. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet*. 2001;68:1428-1436.
- 230. Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics*. 2001;11:77-84.
- 231. Murphy MM, Vilella E, Ceruelo S, Figuera L, Sanchez M, *et al.* The MTHFR C677T, APOE, and PON55 gene polymorphisms show relevant interactions with cardiovascular risk factors. *Clin Chem.* 2002;48:372-375.
- 232. Chen J, Kumar M, Chan W, Berkowitz G, Wetmur JG. Increased Influence of Genetic Variation on PON1 Activity in Neonates. *Environmental Health Perspectives*. 2003;111(11):1403-1409.
- 233. Wang M, Lang X, Zou L, Huang S, Xu Z. Four genetic polymorphisms of paraoxonase gene and risk of coronary heart disease: A meta-analysis based on 88 case-control studies. *Atherosclerosis*. 2011;214:377-385.
- 234. Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J. Four paraoxonase polymorphisms in 11,212 cases of coronary heart disease and 12,786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet*. 2004;363:689-695.
- 235. Lawlor DA, Day IN, Gaunt TR, Hinks LJ, Briggs PJ, et al. The association of the PON1 Q192R polymorphism with coronary heart disease: Findings from the British Women's Heart and Health cohort study and a meta-analysis. *BMC Genet*. 2004;5:17(1-12).
- 236. Tang WH, Hartiala J, Fan Y, Wu Y, Stewart AF, et al.; CARDIoGRAM Consortium, Roberts R, McPherson R, Allayee H, Hazen SL. Clinical and genetic association of serum paraoxonase and arylesterase activities with cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(11):2803-2812.
- 237. Wang M, Lang X, Cui S, Zou L, Cao J, *et al.* Quantitative Assessment of the Influence of Paraoxonase 1 Activity and Coronary Heart Disease Risk. *DNA Cell Biol.* 2012;31:975–82.
- 238. Zhao Y, Ma Y, Fang Y, Liu L, Wu S, *et al.* Association between PON1 activity and coronary heart disease risk: A meta-analysis based on 43 studies. *Mol Genet Metab.* 2012;105:141-148.
- 239. Browne RW, Koury ST, Marion S, Wilding G, Muti P, Trevisan M. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. *Clin Chem.* 2007;53(2):310-317.
- 240. Chen J, Chan W, Wallenstein S, Berkowitz G, Wetmur JG. Haplotype-Phenotype Relationships of Paraoxonase-1. *Cancer Epidemiol Biomark prevent.* 2005;14:731-734.
- 241. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2214-22125.

- 242. Moren X, Deakin S, Liu ML, Taskinen MR, James RW. HDL subfraction distribution of paraoxonase-1 and its relevance to enzyme activity and resistance to oxidative stress. *J Lipid Res.* 2008;49:1246-1253.
- 243. Gaidukov L, Tawfik DS. High affinity, stability, and lactonase activity of serum paraoxonase PON1 anchored on HDL with apoA-I. *Biochem.* 2005;44:11843-11854.
- 244. Kudchodkar BJ, Lacko AG, Dory L, Fungwe TV. Dietary fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. *J Nutr.* 2000;130:2427-2433.
- 245. Vekic J, Kotur J, Jelic Z, Spasic S, Spasojevic V, *et al.* Association of oxidative stress and PON1 with LDL and HDL particle size in middle-aged subjects. *Eur J Clin Invest.* 2007;37:715-723.
- 246. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004;369:78-88.
- 247. Aviram M, Billecke S, Sorenson C, Bisgaier R, Rosenblat M, *et al.* Paraoxonase activity site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1617-1624.
- 248. Rosenblat M, Vaya J, Shih D, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage colesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atheroscler*. 2005;179:69-77.
- 249. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase–A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23;461-467.
- 250. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*. 1998;394:284-287.
- 251. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation*. 2002;106:484-490.
- 252. Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290:21-27.
- 253. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase activity. *Biochem Pharmacol.* 2005;69:541-550.
- 254. Hong SH, Song J, Min WK, Kim JQ. Genetic variations of the paraoxonase gene in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem.* 2001;34:475-481.
- 255. Leus FR, Zwart M, Kastelein JJ, Voorbij HA. PON2 gene variant are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in hypercholesterolemia patients. *Atheroscler.* 2001;154(3):641-649.
- 256. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, *et al.* Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low-density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2001;276:44444-44449.
- 257. Stoltz DA, Ozer EA, Recker TJ, Estin M, Yang X, *et al.* A common Mutation in Paraoxonase-2 Results in Impaired Lactonase Activity. *J Biol Chem.* 2009;284(51):35564-35571.
- 258. Chen Q, Reis SE, Kammerer CM, McNamara DM, Holubkov R, *et al.* Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Am J Hum Genet.* 2003;72:13-22.
- 259. Martinelli N, Girelli D, Olivieri O, Stranieri C, Trabetti E, *et al.* Interaction between smoking and PON2 Ser311Cys polymorphism as a determinant of the risk of myocardial infarction. *Eur J Clin Invest.* 2004;34:14-20.

- 260. Shanguera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet.* 1998;62:36-44.
- 261. Su S, Chen J, Huang J, Wang X, Zhao J, et al. Paraoxonase gene cluster variations associated with coronary heart disease in Chinese Han women. Chinese Med J. 2005;114(14):1167-1174.
- 262. Marchegiani F, Spazzafumo L, Provinciali M, Cardelli M, Olivieri F, *et al.* Paraoxonase 2 C311S polymorphism and low levels of HDL contribute to a higher mortality risk after acute myocardial infarction in elderly patients. *Mol Genet Metab.* 2009;98(3):314-318.
- 263. Jalilian A, Javadi E, Akrami M, Fakhrzadeh H, Heshmat R, *et al.* Association of Cys311Ser Polymorphism of Paraoxonase-2 Gene with the Risk of Coronary Artery Disease. *Arch Iranian Med.* 2008;11(5):544-549.
- 264. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng CJ, Hama S, *et al.* Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:542-547.
- 265. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem.* 2000;275:33435-33442.
- 266. Khersonsky O, Rosenblat M, Toker L, Yacobson S, Hugenmatter A, *et al.* Directed evolution of serum paraoxonase PON3 by family shuffling and ancestor/consensous mutagenesis, and its biochemical characterization. *Biochem.* 2009;48(28):6644-66454.
- 267. Labrecque B, Beadry D, Mayhue M, Bordignon V, Murphy BD, Palin MF. Molecular characterization and expression analysis of the porcine paraoxonase 3 (PON3) gene. *Gene*. 2009;443(1-2):110-120.
- 268. Zhang C, Peng W, Wang M, Zhu J, Zang Y, et al. Studies on protective effects of human paraoxonasas 1 and 3 on atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Gene Ther.* 2010;17:626-633.
- 269. Mukamal KJ, Pai JK, Jensen MK, Rimm EM. Paraoxonase 1 Polymorphisms and risk of Myocardial Infarction in Women and Men. *Circulation J.* 2009;73:1302-1307.
- 270. Mueller RF, Hornung S, Furlong CE, Anderson J, Gi ER, Motulsky AG. Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family, biochemical and linkage studies. *Am J Hum Genet.* 1983;35:393-408.
- 271. Cole T, Jampsa RL, Walter BJ, Arndt TL, Richter RJ, *et al.* Expression of human paraoxonase (PON1) during development. *Pharmacogenetics*. 2003;13:357-364.
- 272. Garcés C, López SL, Rubio R, Benavente M, Cano B, *et al.* High-density lipoprotein colesterol and paraoxonase 1 (PON1) genetics and serum PON1 activity in prepubertal children in Spain. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(6):809-813.
- 273. Holzer M, Trieb M, Konya V, Wadsack C, Heinemann A, Marsche G. Aging affects high-density lipoprotein composition and function. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(9):1442-1448.
- 274. Campo S, Sardo MA, Trimarchi G, Bonaiuto M. Association between serum paraoxonase (PON1) gene prpmoter T(-107)C polymorphism, PON1 activity and HDL levels in healthy Sicilian octogenarians. *Exp Gerontol.* 2004;39(7):1089-1094.
- 275. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992;339:572-575.
- 276. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res.* 2003;59:824-833.
- 277. Wang J, Sim AS, Wang XL, Salonikas C, Naidoo D, Wilcken DE. Relations between plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) and risk factors for coronary disease. *Atheroscler*. 2006;184:383-388.
- 278. Dobzhansky T. Biology, Molecular and Organismic. Am Zool. 1964;4:443-452.

- 279. Waddington C. The epigenotype. Endeavour. 1942;1:18-20.
- 280. Goldberg AD, Allis D, Bernstein E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. Cell. 2007;128:635-638.
- 281. Bird A. Perceptions of epigenetics. Nature. 2007;447:396-398.
- 282. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello GC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*. 1998;391:806-811.
- 283. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/press.html.
- 284. Dolinoy DC. The agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. *Nutr Rev.* 2008;66(Suppl 1):1-8.
- 285. Turunen MP, Aavik E, Ylä-Herttuala S. Epigenetics and aterosclerosis. Review. *Biochem Biophys Act.* 2009;1790:886-891.
- 286. Cassiday L. Mapping The Epigenome. New tools chart chemical modifications of DNA and its packaging proteins. *Chem Engin News*. 2009;87(37):11-16.
- 287. Esteller M. Epigenetics in cancer. N Engl J Med. 2008;358:1148-1159.
- 288. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*. 2007;447:433-440.
- 289. Gallo P, Latronico MV, Gallo P, Grimaldi S, Borgia F, *et al.* Inhibition of class I histone deacetylase with an apicidin derivative prevents cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res.* 2008;80:416-424.
- 290. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:769-784.
- 291. Epigenomics Help [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). Epigenomics Scientific Background. 2010 Aug 31 (Updated 2011 Jan 20). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45788/.
- 292. Kaneda R, Ueno S, Yamashita Y, Choi YL, Koinuma K, et al. Genome-wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes. *Circ Res.* 2005;97:210-218.
- 293. Holliday R. Epigenetics: a historical overview. Epigenetics. 2006;1:76-80.
- 294. Whitelaw NC, Whitelaw E. How lifetimes shape epigenotype within and across generations. *Hum Mol Genet*. 2006;15(Spec No 2):R131-137.
- 295. Turan N, Katari S, Coutifaris C, Dapienza C. Explaining interindividual variability in phenotype: is epigenetics up to the challenge? *Epigenetics*. 2010;5:16-19.
- 296. Bonetta L. Epigenomics: The New Tool in Studying Complex Diseases. Nature Publishing Group. *Nature*. 2008;454:795-798.
- 297. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. Science. 2001;293:1074-1080.
- 298. Gluckman PD, Lillycrop KA, Vickers MH, Pleasants AB, Phillips ES, *et al.* Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(31):12796-12800.
- 299. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol.* 2007;19(1):1-19.
- 300. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Non-genomic transgenerational inheritance of disease risk. *BioEssays*. 2007;29(2):145-154.
- 301. Sutherland JE, Costa M. Epigenetics and the environment. Ann NY Acad Sci. 2003;983:151-160.

- 302. Relton CL, Smith GD. Epigenetic Epidemiology of Common Complex Disease: Prospects for Prediction, Prevention, and Treatment. *PLoS Med.* 2010;7(10):e1000356(1-8).
- 303. Schneider E, Pliushch G, Hajj NE, Galetzka D, Puhl A, *et al.* Spatial, temporal and interindividual epigenetic variation of functionally important DNA methylation patterns. *Nucleic Acids Research.* 2010;38(12):3880-3890.
- 304. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. 2002;16:6-21.
- 305. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci.* 2004;7(8):847-854.
- 306. Contu R, Michael VGL, Condorelli G. Circulating MicroRNAs As Potential Biomarkers of Coronary Artery Disease: A Promise to Be Fulfilled?. *Circ Res.* 2010;107:573-574.
- 307. Ehrlich M, Gama MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, *et al.* Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* 1982;10:2709-2721.
- 308. Hiltunen MO, Turunen MP, Hakkinen TP, Rutanen J, Hedman M, et al. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions. *Vasc Med.* 2002;7:5-11.
- 309. Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet.* 2006;15(Spec No 1):R95-101.
- 310. Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol.* 2007;213:384-390.
- 311. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 1997;13:335-340.
- 312. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001;293:1089-1093.
- 313. Iguchi SM, Schaffner W. CpG methylation of the cAMP responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev.* 1989;3:612-619.
- 314. Lorincz MC, Dickerson DR, Schmitt M, Groudine M. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11:1068-1075.
- 315. Deangelis JT, FarringtonWJ, Tollefsbol TO. An overview of epigenetic assays. *Mol Biotechnol.* 2008;38:179-183.
- 316. Wade PA, Gegonne A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, *et al.* Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet.* 1999;23:62-66.
- 317. Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. Annu Rev Biochem. 2005;74:481-514.
- 318. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2002;3:662-673.
- 319. Zhu JK. Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. Annu Rev Genet. 2009;43:143-166.
- 320. Richmond TJ, Davey CA. The structure of DNA in the nucleosome core. Nature. 2003;423:145-150.
- 321. Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 2001;15:2343-2360.
- 322. Thatcher TH, Gorovsy MA. Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:174-179.
- 323. Watson JD. Celebrating the genetic jubilee: a conversation with James D. Watson. *Sci Am.* 2003;288(4)66-69.

- 324. Bassett A, Cooper S, Wu C, Travers A. The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19:159-165.
- 325. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell. 2007;128:693-705.
- 326. Hsu TC. Differential rate in RNA synthesis between euchromatin and heterochromatin. *Exp Cell Res*.1962;27:332-334.
- 327. Fish JE, Matouk CC, Rachlis A, Lin S, Tai SC, et al. The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. *J Biol Chem.* 2005;280(26):24824-24838.
- 328. Villeneuve LM, Reddy MA, Lanting LL, Wang M, Meng L, Natarajan R. Epigenetic histone H3 lysine 9 methylation in metabolic memory and inflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells in diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(26):9047-9052.
- 329. Cheung P, Lau P. Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol.* 2005;19:563-573.
- 330. Li W, Nagaraja S, Delcuve GP, Hendzel MJ, Davie JR. Effects of histone acetylation, ubiquitination and variants on nucleosome stability. *Biochem J.* 1993;296 (3):737-744.
- 331. Munshi A, Shafi G, Aliya N, Jyothy A. Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics*. 2009;36:75-88.
- 332. Lan F, Nottke AC, Shi Y. Mechanisms involved in the regulation of histone lysine Demethylases. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20(3):316-325.
- 333. Schroen B, Heymans S. MicroRNAs and beyond: the heart reveals its treasures. *Hypertension*. 2009;54:1189-1194.
- 334. Burton PR,Clayton DG,Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, *et al.* Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447:661-678.
- 335. Soifer HS, Rossi JJ, Saetrom P. MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol Ther.* 2007;15:2070-2079.
- 336. Costa FF. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. Gene. 2008;410:9-17.
- 337. Santos CB, Pimentel MMG. Implications of abnormal epigenetic patterns for human diseases. *Eur J Hum Genet*. 2007;15:10-17.
- 338. Ptak C, Petronis A. Epigenetics and complex disease: from etiology to new therapeutics. Review. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:257-276.
- 339. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genet.* 2003;33(Suppl):245-254.
- 340. Barlow D. Gametic imprinting in mammals. Science. 1995;270:1610-1613.
- 341. Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Sem Cancer Biol.* 2002;12:389-398.
- 342. Delrue MA, Michaud JL. Fat chance: genetic syndromes with obesity. Clin Genet. 2004;66(2):83-93.
- 343. Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P. Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. Review. *Hum Mol Genet.* 2003;12(Spec No 1):R61-68.
- 344. van Vliet J, Oates NA, Whitelaw E. Epigenetic mechanisms in the context of complex diseases. Review. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(12):1531-1538.

- 345. Lee ME, Wang H. Homocysteine and hypomethylation: a novel link to vascular disease. *Trends Cardiovas Med.* 1999;9:49-54.
- 346. Brosnan JT. Homocysteine and cardiovascular disease: interactions between nutrition, genetics and lifestyle. *Can J Appl Physiol.* 2004;29:773-780.
- 347. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. Am J Clin Nutr. 2006;83:456S-460S.
- 348. McMullen S, Langley-Evans SC. Sex-specific effects of prenatal low-protein and carbenoxolone exposure on renal angiotensin receptor expression in rats. *Hypertension*. 2005;46:1374-1380.
- 349. Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr.* 2005;135:1382-1386.
- 350. Zaina S, Lindholm MW, Lund G. Nutrition and aberrant DNA methylation patterns in atherosclerosis: more than just hyperhomocysteinemia?. *J Nutr.* 2005;135(1):5-8.
- 351. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ.* 2006; 174(3):341-348.
- 352. Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *J Nutr.* 2002;132(Suppl 8):2382S-2387S.
- 353. Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hipomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1775:138-162.
- 354. Sohn KJ, Jang H, Campan M, Weisenberger DJ, Dickhout J, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation induces cell-specific changes in genomic DNA methylation and uracil misincorporation: a possible molecular basis for the site-specific cancer risk modification. *Int J Cancer*. 2009;124(9):1999-2005.
- 355. Chang PY, Lu SC, Lee CM, Chen YJ, Dugan TA, Huang WH. Homocysteine inhibits arterial endothelial cell growth through transcriptional downregulation of fibroblast growth factor-2 involving G protein and DNA methylation. *Circ Res.* 2008;102:933-941.
- 356. Lund G, Andersson L, Lauria M, Lindholm M, Fraga MF, et al. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. J Biol Chem. 2004;279:29147-29154.
- 357. Wagner C, Koury MJ. Plasma S-adenosylhomocysteine versus homocysteine as a marker for vascular disease. *J Nutr.* 2008;138:980.
- 358. Liu C, Wang Q, Guo H, Xia M, Yuan Q, *et al.* Plasma S-adenosylhomocysteine is a better biomarker of atherosclerosis than homocysteine in Apolipoprotein E-deficient mice fed high dietary methionine. *J Nutr.* 2008;138:311-315.
- 359. Barber JR, Clarke S. Inhibition of protein carboxyl methylation by S-adenosyl-L-homocysteine in intact erythrocytes. Physiological consequences. *J Biol Chem.* 1984;259:7115-7122.
- 360. Hiltunen MO, Ylä-Herttuala S. DNA methylation, smooth muscle cells, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1750-1753.
- 361. Castro R, Rivera I, Struys EA, Jansen EE, Ravasco P, et al. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem.* 2003;49(8):1292-1296.
- 362. Post WS, Goldschmidt PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, *et al.* Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 1999;43:985-991.
- 363. Chan Y, Fish JE, D'Abreo C, Lin S, Robb GB, et al. The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation. *J Biol Chem.* 2004;279(33):35087-35100.

- 364. Chan GC, Fish JE, Mawji LA, Leung DD, Rachlis AC, Marsden PA. Epigenetic basis for the transcriptional hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene in vascular endothelial cells. *J Immunol.* 2005:175(6):3846-3861.
- 365. Luoma JS, Strålin P, Marklund SL, Hiltunen TP, Särkioja T, Ylä-Herttuala S. Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions-colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(2):157-167.
- 366. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, *et al.* Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(11):2479-24788.
- 367. Hastings NE, Simmers MB, McDonald OG, Wamhoff BR, Blackman BR. Atherosclerosis-prone hemodynamics differentially regulates endothelial and smooth muscle cell phenotypes and promotes proinflammatory priming. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293:C1824-C1833.
- 368. Yu Z, Kone BC Hypermethylation of the inducible nitric oxide synthase gene promoter inhibits its transcription. *J Biol Chem.* 2004; 279(45):46954-46961.
- 369. Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation*. 2001;103(22):2717-2723.
- 370. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmölzer I, Upson BM, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2003;108(8):933-938.
- 371. Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 279(4):F671-F678.
- 372. Jiang Y, Sun, T, Xiong J, Cao J, Li G, Wang S. Hyperhomocysteinemia-mediated DNA Hypomethylation and its Potential Epigenetic Role in Rats. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2007;39(9):657-667.
- 373. Butcher LM, Beck S. Future impact of integrated high-throughput methylome analyses on human health and disease. *J Genet Genomics*. 2008;35(7):391-401.
- 374. Wilson VL, Jones PA. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science*. 1983;220(4601):1055-1057.
- 375. Zhou J, Werstuck GH, Lhoták S, de Koning ABL, Sood SK, et al. Association of multiple cellular stress pathways with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2004;110:207-213.
- 376. Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, *et al.* Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet.* 2001;10:433-443.
- 377. Jiang Y, Zhang J, Xiong J, Cao J, Li G, Wang S. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor inhibit homocysteine-induced DNA methylation of inducible nitric oxide synthase gene. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007;39(5):366-376.
- 378. Baric I, Fumic K, Glenn B, Cuk M, Schulze A, et al. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101:4234-4239.
- 379. Jiang X, Yang F, Tan H, Liao D, Bryan RM Jr, et al. Hyperhomocystinemia impairs endothelial function and eNOS activity via PKC activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(12):2515-2521.
- 380. Böger RH. Association of asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:1467-1472.

- 381. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, *et al.* Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation*. 1999;99:1141-1146.
- 382. Böger RH, Bode-Böger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, et al. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. J Am Coll Cardiol. 2000;36:2287-2295.
- 383. Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development*. 2000;127:1607-1616.
- 384. Tector AJ, Schmahl TM, Janson B, Kallies JR, Johnson G. The Internal Mammary Artery Graft. Its Longevity After Coronary Bypass. *JAMA*. 1981;246:2181-2183.
- 385. Sisto T, Isola J. Incidence of atherosclerosis in the internal mammary artery. *Ann Thorac Surg.* 1989;47:884-886.
- 386. Frazier BL, Flemma RJ, Tector AJ, Korns ME. Atherosclerosis involving the internal mammary artery. *Ann Thorac Surg.* 1974;18:305-307.
- 387. Singh RN. Atherosclerosis and the Internal Mammary Arteries. Cardiovasc Intervent Radiol. 1983; 6:72-77.
- 388. Essalat M, Mirkhani SH, Ghasemi M, Zarezadeh M, Sanatkar-Far M, *et al.* Atherosclerosis of the internal mammary artery in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Act Med Iran.* 2003; 41(3):189-193.
- 389. Darwazah AK, Shehadeh SM, Sharabati B, Abu Sham'a RAH. Left Internal Mammary Artery Atherosclerosis: Twenty-Three Years After Repair of Aortic Coarctation. *Ann Thorac Surg.* 2008;86:1991-1994.
- 390. Li S, Fan YS, Chow LH., Van Den DC, van DV, et al. Innate diversity of adult human arterial smooth muscle cells: cloning of distinct subtypes from the internal thoracic artery. Circ Res. 2001;89:517-525.
- 391. Abad C, Santana C, Diaz J, Feijoo J. Arteriosclerotic histological evaluation of the internal mammary artery in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg*.1995;9:198-201.
- 392. Molin DGM, Post MJ. Do intrinsic arterial wall features determine aterosclerosis susceptibility?. *Cardiovasc Research*. 2006;72(1):3-4.
- 393. Mekontso-Dessap A, Kirsch M, Guignambert C, Zadigue P, Adnot S, *et al.* Vascular-wall remodeling of 3 human bypass vessels: organ culture and smooth muscle cell properties. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;131:651-658.
- 394. Frischknecht K, Greutert H, Weisshaupt C, Kaspar M, Yang Z, *et al.* Different vascular smooth muscle cell apoptosis in the human internal mammary artery and the saphenous vein. Implications for bypass graft disease. *J Vasc Res.* 2006;43:338-346.
- 395. Qin M, Zeng Z, Zheng J, Shah PK, Schwartz SM, et al. Suppression subtractive hybridization identifies distinctive expression markers for coronary and internal mammary arteries. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23:425-433.
- 396. Sons HJ, Godehardt E, Kunert J, Losse B, Bircks W. Internal thoracic artery; prevalence of atherosclerotic changes. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;106:1192-1195.
- 397. Rissanen V. Aortic coronary atherosclerosis in a finish autopsy series of violent deaths. *Ann Acad Sci Fenn* [A]. 1972;155:25-53.
- 398. Mestres CA, Rives A, Igual A, Vehi C, Murtra M. Atherosclerosis of the internal mammary artery. Histopathological analysis and implications on its results in coronary artery bypass graft surgery. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1986;34:356-358.
- 399. Sims FH. A comparison of coronary and internal mammary arteries and implications of the results in the etiology of arteriosclerosis. *Am Heart J.* 1983;105(4):560-566
- 400. Wilm B, Ipenberg A, Hastie ND, Burch JB, Bader DM. The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Development*. 2005;132:5317-5328.

- 401. Davis WL, Crawford LA, Cooper OJ, Farmer G, Thomas D, Freeman BL. Generation of radical oxygen species by neural crest cells treated in vitro with isotretinoin and 4-oxo-isotretinoin. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1990;10:295-310.
- 402. Mahadevan VS, Campbell M, McKeown PP, Bayraktutan U. Internal mammary artery smooth muscle cells resist migration and possess high antioxidant capacity. *Cardiovasc Res.* 2006;72:60-68.
- 403. Reddy S, Kumar P, Prasad K. Histomorphometric and sympathetic innervation of the human internal thoracic artery. *CLINICS*. 2011;66(1):131-136.
- 404. Martínez JM, Castaño M, Álvarez JR. Biología y resultados de la arteria mamaria interna. *Cir Cardiovasc.* 2011;18(4):269-275.
- 405. Borović ML, Borović S, Perić M, Vuković P, Marinković J, *et al.* The internal thoracic artery as a transitional type of artery: a morphological and morphometric study. *Histol Histopathol.* 2010;25(5):561-576.
- 406. Luscher TF, Diederich D, Siebenmann R, Lehmann K, Stulz P, *et al.* Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med.* 1988;319:462-467.
- 407. Payeli SK, Latini R, Gebhard C, Patrignani A, Payeli SK, *et al.* Prothrombotic Gene Expression Profile in Vascular Smooth Muscle Cells of Human Saphenous Vein, but Not Internal Mammary Artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:705-710.
- 408. Krane M, Dummler S, Dressen M, Hauner H, Hoffmann M, et al. Identification of an up-regulated anti-apoptotic network in the internal thoracic artery. Int J Cardiol. 2011;149(2):221-226.
- 409. Iris E, Cirak MY, Engin ED, Zor MH, Erer D, *et al.* Detection of Helicobacter pylori DNA in Aortic and Left Internal Mammary Artery Biopsies. *Tex Heart Inst J.* 2008;35(2):130-135.
- 410. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002;105:1541-1544.
- 411. Minamino T, Komuro I. Circ Res. Vascular Cell Senescence: Contribution to Atherosclerosis. 2007;100:15-26.
- 412. Kovacic JC, Moreno P, Hachinski V, Nabel EG, Fuster V. Cellular Senescence, Vascular Disease, and Aging: Part 1 of a 2-Part Review. *Circulation*. 2011;123:1650-1660.
- 413. Kovacic JC, Moreno P, Hachinski V, Nabel EG, Fuster V. Cellular Senescence, Vascular Disease, and Aging: Part 2 of a 2-Part Review: Clinical Vascular Disease in the Elderly. *Circulation*. 2011;123:1900-1910.
- 414. The Senescence Process of Internal Thoracic Artery. Manenti A, Roncati L, Barbolini G, Rivasi F. *J Interdiscipl Histopathol.* 2013;1(2):58-61.
- 415. Fulton J. Harvey Cushing. A Biography. The story of a great medical pioneer. 1946. New York: Blackwell Scientific.
- 416. Carrel A. On the experimental surgery of the thoracic aorta and the heart. Ann Surg. 1910;52:83-87.
- 417. Beck CS. The development of a new blood supply to the heart by operation. *Ann Surg.* 1935;102(5):801-813.
- 418. Vineberg AM. Development of an anastomosis between the coronary vessels and a transplanted internal mammary artery. *Can Med Assoc J.* 1946;55:117-119.
- 419. Longmire WP Jr, Cannon JA, Kattus AA. Direct-vision coronary endarterectomy for angina pectoris. *N Engl J Med.* 1958;259(21):993-999.
- 420. Kolesov VI. Mammary artery-coronary artery anastomosis as method of treatment for angina pectoris. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1967;54:535-544.
- 421. Konstantinov IE. Vasilii I. Kolesov: A Surgeon to Remember. Tex Heart Inst J. 2004; 31(4):349-358.

- 422. Effler DB. Vasilii I. Kolesov: pioneer in coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1988;96:183.
- 423. Effler DB, Groves LK, Sones FM Jr, Shirey EK. Endarterectomy in the treatment of coronary artery disease. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1964;47:98-108.
- 424. Loop FL. In Memoriam Donald B. Effler. *The CardioThoracic Surgery Network*. http://www.ctsnet.org/doc/9821.
- 425. Favaloro RG. Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion: operative technique. *Ann Thorac Surg.* 1968;5:334-339.
- 426. Favaloro RG. Landmarks in the development of coronary artery bypass surgery. *Circulation*. 1998;98:466-478.
- 427. Green CE, Stertzer SH, Reppert EH. Coronary artery bypass grafts. Annal Thorac Surg. 1968;5:443-450.
- 428. Alonso JJ, Azpitarte J, Bardají A, Cabades A, Fernández A, et al. The practical clinical guidelines of the Sociedad Española de Cardiología on coronary surgery. Rev Esp Cardiol. 2000;53:241-266.
- 429. Davidoff R, Edwards FH, Ewy GA, Gardner TJ, Hart JC, *et al.* ACC/AHA 2004 Guideline Update for Coronary Artery Bypass Graft Surgery. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Developed in Collaboration with the American Association for Thoracic Surgery and the Society of Thoracic Surgeons. *JACC*. 2004;44:1146-1154.
- 430. Patel MR, Dehmer GJ, Hirshfeld JW, Smith PK, Spertus JA, *et al.* Coronary Revascularization Writing Group. ACCF/SCAI/STS/AATS/AHA/ASNC 2009. Appropriateness Criteria for Coronary Revascularization. A Report of the American College of Cardiology Foundation Appropriateness Criteria Task Force, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Thoracic Surgeons, American Association for Thoracic Surgery, American Heart Association, and the American Society of Nuclear Cardiology Endorsed by the American Society of Echocardiography, the Heart Failure Society of America, and the Society of Cardiovascular Computed Tomography. *Circulation*. 2009;119:1330-1352.
- 431. Windecker S, Kolh P, Alfonso F, Collet JP, Cremer J, et al. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial Revascularization. The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). Developed with the special contribution of theEuropeanAssociation of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *EHJ. DOI:* http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehu278 2541-2619 First published online: 30 August 2014.
- 432. Loop FD, Lytle BW, Cosgrove DM, Stewart RW, Goormastic M, *et al.* Influence of the internal-mammary-artery graft on 10-year survival and other cardiac events. *N Engl J Med.* 1996;334:216-219.
- 433. Moshkovitz Y, Mohr R, Medalion B, Hyam E, Herz I, *et al.* Drug-Eluting Stents Compared With Bilateral Internal Thoracic Artery Grafts for Diabetic Patients. *Ann Thorac Surg.* 2012;94(5):1455-1462.
- 434. Edwards FH, Clark RE, Schwartz M. The impact of internal mammary artery conduits on operative mortality in coronary revascularization. *Ann Thorac Surg.* 1994;57:27-32.
- 435. NQF. National Voluntary Consensus Standars for Cardiac Surgery. 2004. Washington DC: National Quality Forum.
- 436. Ambulatory care Quality Alliance (AQA) aproved quality measures. http://www.aqaalliance.org/performancewg.htm.
- 437. Shaiam DM, Edwards FH, Ferrais VA, Haan CK, Rich JB, *et al.* Quality measurement in adult cardiac surgery, part 1; conceptual framework and measure selection. *Ann Thorac Surg.* 2007;83:S3-S12.
- 438. Stevens LM, Carrier M, Perrault LP, Hebert Y, Cartier R, *et al.* Single versus bilateral internal thoracic artery grafts with concomitant saphenous vein grafts for multivessel coronary artery bypass grafting: effects on mortality and even-free survival. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127:1408-1415.

- 439. Rizzoli G, Shiavon L, Bellini P. Does the use of bilateral internal mammary artery (IMA) grafts provide incremental benefit relative to the use of a single IMA graft? A meta-analysis approach. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002;22:781-786.
- 440. Burfeind WR Jr, Glower DD, Wechsler AS, Tuttle RH, Shaw LK, *et al.* Single versus multiple internal mammary artery grafting for coronary artery bypass: 15-year follow-up of a clinical practice trial. *Circulation*. 2004;110(Suppl 1):II25-II27.
- 441. Vogel JHK, McFadden B, Spence R, Jahnke CJ, Love JW. Quantitative assessment of myocardial performance and graft patency following coronary bypass with the internal mammary artery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1978;75:487-498.
- 442. Convenio de Asturias de Bioética. Convenio para la protección de los Derechos Humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina. Convenio sobre los Derechos Humanos y la Biomedicina. Oviedo, 4 de abril de 1997. Consejo de Europa. Versión en español del Ministerio de Asuntos Exteriores. http://sescam.jccm.es/web1/gaptalavera/prof calidad/Convenio Asturias Bioetica.pdf.
- 443. Ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD). BOE núm. 298 del 14 de diciembre de 1999. Pags:43088-43099. http://www.boe.es/boe/dias/1999/12/14/pdfs/A43088-43099.pdf.
- 444. Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal (RLOPD). BOE núm. 17 del 19 de enero de 2008. Pags:4103-4136. http://sede.bne.gob.es/SedeElectronica/es/Descargas/RD17202007.pdf.
- 445. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
- 446. Speletas M, Papadopoulos N, Daiou C, Katodritou, Pavlitou A, Galanopoulou V. Relationship between 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase C6677T gene polymorphism and methotrexate related toxicity in patients with autoimmune diseases receiving folic acid supplementation. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:1791-1792.
- 447. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, *et al.* Current Protocols in Molecular Biology (1996). 4.2.1-4.2.9. Preparation and Analisis of RNA-Guanidine Methods for total RNA preparation. Volume I;(Suppl 36). 1996. Massachusetts General Hospital. Harvard Medical School. John Wiley & Sons, Inc. publishers.
- 448. Perna AF, Satta E, Acanfora F, Lombardi C, Ingrosso D, De Santo NG. Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2006;69(5):869-876.
- 449. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Bio Chem. 1951;193:265-275.
- 450. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexo E, Clarke R, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem.* 2004;50:3-32.
- 451. Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, *et al.* Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:704-706.
- 452. Maron BA, Loscalzo J. Homocysteine. Clin Lab Med. 2006;26:591-609.
- 453. Antoniades C, Shirodaria C, Leeson P, Baarholm OA, Van-Assch T, *et al.* MTHFR C677T Polymorphism reveals functional importance for 5-methyltetrahydrofolate, not homocysteine, in regulation of vascular redox state and endothelial function in human atherosclerosis. *Circulation*. 2009;119(18):2507-2515.
- 454. Hu X, Atzler D, Xu X, Zhang P, Guo H, *et al.* Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 is the critical enzyme for degrading the cardiovascular risk factor asymmetrical dimethylarginine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(7):1540-1546.
- 455. Sass JO, Nakanishi T, Sato T, Sperl W, Shimizu A. S-homocysteinylation of transthyretin is detected in plasma and serum of humans with different types of hyperhomocysteinemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;310:242-246.

- 456. Zinellu A, Zinellu E, Sotgia S, Formato M, Cherchi GM, et al. Factors affecting S-homocysteinylation of LDL apoprotein B. Clin Chem. 2006;52:2054-2059.
- 457. Wuchty S, Jones FJ, Uzzzi B. The increasing dominanse of teams in production of knowledge. *Science*. 2007;316:1036-1039.
- 458. Brownstein CA, Brownstein JS, Williams DS 3rd, Wicks P, Heywood JA. The power of social networking in medicine. *Nat Biotechnol.* 2009;27:888-890.
- 459. Mestres CA. Mediocridad y cooperación. Cir Cardiov. 2009;16(3):219-221.
- 460. Bermejo J, Heras M, Segovia J, Alfonso F. Translational cardiovascular medicine. Now or never. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(1):66-68.
- 461. Wehling M. Translational medicine: can it really facilitate the transition of research "from bench to bedside"?. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006;62:91-95.
- 462. Wehling M. Translational medicine: science or wishful thinking?. J Transl Med. 2008;6:31-33.
- 463. Szyf M. Toward a discipline of pharmacoepigenomics. Curr Pharmacogenomics. 2004;2:357-377.
- 464. Zerhouni EA. Clinical research at a crossroads: the NIH roadmap. J Investig Med. 2006;54:171-173.
- 465. Zerhouni EA. Translational and clinical science-time for a new vision. N Engl J Med. 2005;353:1621-1623.
- 466. Zerhouni EA. US biomedical research: basic, translational, and clinical sciences. *JAMA*. 2005;294:1352-1358.
- 467. Fuster V, Torres M. CNIC: Achieving Research Excellence Through Collaboration. *Rev Esp Cardiol.* 2012;65(6):511-516.
- 468. Sanz G, Fuster V. The Spanish National Cardiovascular Research Center: a new phase. *Rev Esp Cardiol*. 2008;61:1-5.
- 469. Alonso LA, Borrás X, Brugada J, Cinca J, Fernández A, *et al.* Clinical and Preclinical Heart Failure Research Network (REDINSCOR). Instituto de Salud Carlos III Cooperative Special Topic Research Networks. *Rev Esp Cardiol.* 2008;61:76-81.
- 470. Marrugat J, López JR, Heras M, Tamargo J, Valverde M. The HERACLES Cardiovascular Network. *Rev Esp Cardiol*. 2008:61:66-75.
- 471. García D, Castro A, Díez J, Gabriel R, Gimeno JR, *et al.* Cooperative Cardiovascular Disease Research Network (RECAVA). *Rev Esp Cardiol.* 2008;61:58-65.

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias de la Salud

Jaime Alberto Serna Gómez MD.

Las Palmas de Gran Canaria | 2015