

CLÍNICA E INVESTIGACIÓN EN ARTERIOSCLEROSIS

www.elsevier.es/arterio



REVISIÓN

Hiperhomocisteinemia. Panorama actual y contribución del ratón a su estudio

Mario Nuño-Ayala^a, Ricardo Carnicer^a, Mario Alberto Guzmán^a, Natalia Guillén^{a,c},
María Ángeles Navarro^{a,c}, Carmen Arnal^{b,c} y Jesús Osada^{a,c,*}

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Universidad de Zaragoza, Salud del Gobierno de Aragón, Zaragoza, Aragón, España

^bDepartamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Aragón, España

^cCIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

Recibido el 23 de diciembre de 2009; aceptado el 22 de abril de 2010

Disponible en Internet el 14 de julio de 2010

PALABRAS CLAVE

Homocisteína;
Hiperhomocisteinemia;
Ratón modificado genéticamente

Resumen

La homocisteína (HCY) es un aminoácido cuya elevación sanguínea se asocia con el desarrollo de enfermedades de tipo vascular, neurológico y reproductivo. Sus niveles plasmáticos varían en función de la raza, el sexo, la edad y otros factores ambientales. En la presente revisión se aborda su metabolismo, su fisiopatología y las consecuencias clínicas de su elevación. Un énfasis especial se presta al empleo del ratón como modelo experimental en este campo, ya que su uso ha puesto de manifiesto la importancia de la dieta en la regulación de la HCY. Esto, unido al desarrollo de animales modificados genéticamente con hiperhomocisteinemia, está permitiendo una rápida caracterización de los mecanismos moleculares implicados en la acción *in vivo* de la HCY. Además, la combinación de estos modelos con otros modificados genéticamente permite definir la influencia de la combinación de factores de riesgo en el desarrollo de diversas patologías. A su vez, la exploración en estos nuevos modelos de factores ambientales y/o farmacológicos contribuye de este modo a explicar muchas de las evidencias epidemiológicas en humanos así como el tratamiento más adecuado para cada condición.

© 2009 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

Hyperhomocysteinemia. Current overview and contribution of mice to research on the topic

Abstract

Homocysteine is an amino acid whose plasma levels are associated with the development of vascular, neurologic and reproductive diseases. Plasma levels show a wide range of

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: Josada@unizar.es (J. Osada).

Genetically-modified mice

values according to age, sex, race and other environmental factors. The present review discusses homocysteine metabolism and physiopathology and the clinical consequences of increased levels of this substance.

Special emphasis has been placed on the use of mice as an experimental animal model in this field, since their use has unveiled the contribution of dietary modifications on plasma homocysteine levels. These findings, together with the generation of genetically-modified mice as models of hyperhomocysteinemia, are allowing rapid progress to be made in the characterization of the *in vivo* molecular mechanisms of homocysteine action. Crosses among these genetically-modified mice and others with different deleted genes will increase knowledge of the influence of the combination of several risk factors on pathological development. In these models, research into new environmental or pharmacological factors may yield results that could explain epidemiological findings in humans and help in the design of new treatments for specific clinical settings.

© 2009 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

Introducción

En los últimos años ha crecido el interés por la hiperhomocisteinemia (HHCY) como factor de riesgo asociado a las enfermedades cardiovasculares¹⁻⁴ en un intento por conocer mejor los mecanismos etiopatogénicos de estas y dado que su morbilidad continúa siendo particularmente importante en los países industrializados y, en concreto, en España⁵.

El tabaquismo, las dislipemias, la hipertensión arterial y la diabetes son factores de riesgo clásicos que se asocian con la aparición prematura de la enfermedad cardiovascular⁶; sin embargo, algunos pacientes con manifestaciones clínicas de aterosclerosis precoz no presentan ninguno de estos factores, con la excepción del hallazgo de una HHCY.

La hipótesis de que la homocisteína (HCY) estaba implicada en las lesiones vasculares fue propuesta por McCully⁷, al observar en pacientes con severa HHCY sin tratar un 50% más de posibilidades de sufrir un problema vascular antes de los 30 años, como ictus, infarto de miocardio o tromboembolismo venoso⁸. El riesgo se reducía cuando se empleaban tratamientos para disminuir la HCY, aunque no se alcanzaban los niveles normales⁹.

Metabolismo de la homocisteína

La HCY es un aminoácido azufrado que se forma durante el catabolismo de la metionina. Las estructuras de ambos aminoácidos están reflejadas en la figura 1. Este último aminoácido esencial, aportado por las proteínas de la dieta, es un componente de péptidos y proteínas, y para su utilización metabólica se activa a S-adenosil metionina, coenzima que desempeña un papel importante en la

transferencia de grupos metilos. La S-adenosil metionina transfiere su grupo metilo y se transforma en S-adenosil HCY, que posteriormente se hidroliza a HCY en las células. Una vez sintetizada, la HCY puede seguir varias rutas metabólicas dentro del organismo: la ruta de transulfuración, la ruta de remetilación y la excreción por la orina^{10,11}. Un esquema del metabolismo de la HCY se recoge en la figura 2.

La HCY sigue el camino de transulfuración cuando existe un exceso de metionina o cuando se requiere la síntesis de cisteína. En esta vía, la HCY se condensa con una molécula de serina para formar cistationina en una reacción catalizada por la cistationina betasintasa (CBS), que utiliza la vitamina B₆ como cofactor. A continuación, la cistationina gammaliasa (CGL) con la ayuda de nuevo de la vitamina B₆ cataliza la hidrólisis de cistationina para dar lugar al alfacetobutirato y la cisteína^{12,13}. Ambas enzimas (CBS y CGL) son responsables de la biosíntesis del sulfuro de hidrógeno (H₂S) en mamíferos. La CBS puede generar la desulfuración de varias formas: al actuar sobre la cisteína para generar serina o por condensación de dos cisteínas para generar lantionina. La participación de la CBS en la biosíntesis del H₂S disminuye en condiciones de HHCY¹⁴. La CBS también es un sensor de CO, y mediante la liberación de H₂S participa en la regulación del metabolismo de la hemooxigenasa (HO)¹⁵. La CGL condensa dos moléculas de HCY para formar H₂S y hololantionina. Este último proceso aumenta en la medida en que se eleva la HHCY y es particularmente relevante en concentraciones superiores a 200 μmol/l¹⁶.

En la ruta de remetilación, la HCY se transforma en metionina. En el hombre, aproximadamente el 50% de la HCY sufre este destino en condiciones normales y resulta particularmente importante en situaciones de baja ingesta proteica^{17,18}. En la mayoría de los tejidos, la remetilación se produce a través de una reacción catalizada por la metionina sintasa (MS), que requiere de vitamina B₁₂ como cofactor y de metiltetrahidrofolato como cosustrato. Esta vía necesita de un adecuado aporte de ácido fólico y de la actividad de otra enzima denominada metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)^{19,20}. También se puede producir la remetilación a través de la betaína HCY metiltransferasa, reacción restringida al hígado, al riñón y a las glándulas suprarrenales y que, además, no requiere la presencia de

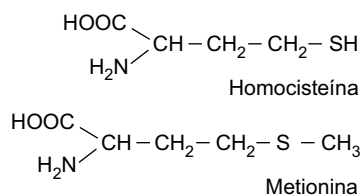


Figura 1 Estructuras químicas de la metionina y de la homocisteína.

La homocisteína como factor de riesgo cardiovascular

Existe una correlación entre los niveles de HHcy y el incremento del riesgo en la enfermedad coronaria^{38,39}, el infarto de miocardio^{40,41}, la enfermedad oclusiva periférica³², la enfermedad oclusiva cerebral⁴² y la enfermedad oclusiva vascular retinal⁴³. En algunas poblaciones puede ser particularmente importante. Así, Selhub et al en el «Framingham Heart Study» encontraron que la incidencia de HHcy era de un 29,3% en un grupo de 1.041 individuos adultos de entre 67–96 años de edad³². También encontraron una correlación lineal entre el riesgo de infarto y los niveles de HHcy. La HHcy se reveló, asimismo, como un factor de riesgo para la trombosis venosa, particularmente en las mujeres⁴⁴. La presencia de niveles de HHcy superiores a 12 µmol/l está relacionada directamente con la progresión de la placa coronaria⁴⁵. Sin embargo, se ha generado cierta controversia a raíz de los resultados obtenidos en estudios clínicos de tratamiento de la HHcy con suplementos de vitaminas del grupo B, donde se observó una disminución de la concentración plasmática de HHcy pero no del riesgo vascular, lo cual vendría a enfatizar la mayor relación de la HHcy con el riesgo de enfermedad cerebrovascular que con el de enfermedad cardiovascular (una detallada revisión de estos últimos aspectos se puede encontrar en el reciente trabajo de Méndez-González et al⁴⁶). Se ha observado disfunción vasomotora endotelial en vasos de pequeña resistencia, como las arterias mesentéricas o las cerebrales, con leves aumentos en la concentración de HHcy: entre 10–20 µmol/l^{47–50}. En cambio, en ratón, para producir daños en los grandes vasos, como la aorta o la carótida, sería necesario alcanzar concentraciones plasmáticas por encima de 20 µmol/l^{51,52}.

En modelos experimentales con HHcy también se han observado alteraciones estructurales en la pared de los vasos: hipertrofia, remodelado, mecánica vascular alterada, aumento de la fragilidad de los vasos^{53–56}, aumento de formación de la íntima⁵⁷ y trombosis acelerada⁵⁸. En este sentido, se ha observado que la presencia de HHcy potencia el desarrollo de aterosclerosis en animales susceptibles de desarrollarla, como los ratones carentes de apolipoproteína E (ApoE)⁵⁹. Sin embargo, ninguno de los modelos animales estudiados ha demostrado aterosclerosis espontáneamente. También se ha demostrado que una dieta con alta cantidad de metionina puede causar aterosclerosis en ausencia de aumento de HHcy en el plasma⁶⁰. Por todo lo anterior, se considera la homocisteinemia elevada como un factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular.

Homocisteína y enfermedad renal

La insuficiencia renal crónica es otra patología en la que se ha descrito la presencia de niveles elevados de HHcy⁶¹. Estos autores encontraron una correlación positiva entre los niveles de HHcy y de creatinina, lo cual podría ser debido a una disminución del metabolismo renal y/o de su excreción⁶². Igualmente, se observaron concentraciones de HHcy particularmente elevadas ($26,6 \pm 1,5$ µmol/l) en pacientes con enfermedad renal terminal sometidos a hemodiálisis³⁴. El aporte de H₂S redujo el daño renal inducido por la

HHcy⁶³, al igual que el estrés oxidativo. Esto sugiere que el aporte de NaHS/H₂S puede reducir el estrés oxidativo de la HHcy y ser una herramienta terapéutica⁶⁴.

La homocisteína como factor de riesgo en reproducción

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado una asociación entre alteraciones del metabolismo de la metionina y la HHcy y casos de embarazos fallidos con aborto espontáneo, infartos de la placenta o bajo peso al nacer^{65,66}. También se han descrito niveles altos de HHcy en casos de gestaciones complicadas con enfermedades vasculares de la placenta o preeclampsia en comparación con los encontrados en embarazos normales^{67,68}.

La enzima CBS se expresa en el hígado y en la decidua, mientras que la enzima MS se expresa en todos los tejidos embrionarios^{69,70}. En el ratón carente de la enzima CBS, las hembras eran infértiles⁷¹. Para caracterizar el fallo reproductivo, nuestro grupo realizó el trasplante de ovarios de hembras carentes de CBS a hembras normales ovariectomizadas y se obtuvieron camadas normales en cuanto al número de crías, indicando que el problema que produce infertilidad era consecuencia de la falta de CBS y del aumento de HHcy en el útero gestante⁷². Estos resultados plantean el reto de investigar si el útero humano es tan sensible al efecto de la HHcy.

Homocisteína y enfermedades neurológicas

La elevación de la HHcy en el plasma se ha relacionado de manera convincente con enfermedades geriátricas del cerebro, como declive de consciencia^{73–75}, enfermedades cerebrovasculares^{76,77}, demencia vascular^{78,79} y enfermedad de Alzheimer^{80–84}. Además, podría estar relacionada con otras enfermedades como la depresión⁸⁵ y la esquizofrenia^{86,87}. En la mayoría de estos estudios, las asociaciones continúan siendo fuertes aunque se ajusten parámetros importantes en la HHcy, como la función renal y el estatus vitamínico⁸⁸.

Se han propuesto cuatro posibles mecanismos de lesión neuronal debida a la HHcy; el primero, la posibilidad de una acción neurotóxica de la HHcy mediante la alteración de los neurotransmisores o la producción de excitotoxicidad en las neuronas^{89–91}. En concreto, se ha descrito una competencia del compuesto por los receptores de GABA-A y una activación de la ruta de la quinasa ERK⁹². El segundo mecanismo propone que el aumento de HHcy indica una alteración metabólica que afecta al cerebro a través de la acumulación de S-adenosil HHcy, un inhibidor de las reacciones de metilación vitales para las funciones neurológicas⁹³. La tercera posibilidad es la relación de la HHcy con enfermedades oclusivas de los vasos sanguíneos mediante el daño de la pared vascular o el impedimento de la coagulación sanguínea. La cuarta contempla una acción sobre la microglia⁹⁴. En estudios *in vivo* no se ha observado una relación directa entre el aumento de HHcy y las lesiones cerebrales, lo que se explicaría, en parte, por la baja concentración de este compuesto alcanzada en el líquido cefalorraquídeo que está muy lejos de la necesaria para causar neurotoxicidad *in vitro*^{95,96}.

También se ha propuesto que no fuese una acción propia, sino que la HCY pudiera potenciar las lesiones producidas por otras causas como las producidas mediante la inyección de kainato⁹⁵, la mutación de la proteína precursora de amiloide que se da en ratones transgénicos para esta proteína, que desarrollan enfermedad de Alzheimer⁹⁷, o en la inducción farmacológica de la enfermedad de Parkinson⁹⁸.

Homocisteína y otras patologías

La HHCY también es un factor independiente en fracturas osteoporóticas en ancianos y está asociada con la disminución de la densidad ósea⁹⁹⁻¹⁰¹. Además, está relacionada de manera directa con la presión arterial; se ha determinado que un aumento de 5 μ M está asociado con un incremento de 0,5 y de 0,7 mmHg en la presión sistólica de hombres y mujeres, respectivamente¹⁰². La HHCY puede alterar la configuración de la retina por cambios transcripcionales¹⁰³. Y, por último, se ha encontrado relación entre los niveles de HCY y la resistencia a la insulina en pacientes obesos no diabéticos¹⁰⁴. En esta última acción parece estar implicada una inducción de la secreción de resistina adipocitaria por parte de la HCY mediada por aumento de estrés oxidativo, proteína quinasa C y NF- κ B¹⁰⁵.

Etiología de la hiperhomocisteinemia

La HHCY puede ser congénita o adquirida, y esta a su vez puede ser de origen multifactorial. Estas posibilidades se resumen en la [tabla 1](#).

La causa congénita más frecuente es el defecto de la CBS, cuyo gen se halla ubicado en el cromosoma 21^{106,107}. El defecto se transmite de forma autosómica recesiva. La deficiencia de CBS en homocigosis tiene una incidencia de entre 1:58.000–1:1.000.000, dependiendo del país estudiado^{8,108}. En esta situación, los pacientes pueden llegar a tener valores de HCY plasmática de hasta 400 μ mol/l. La frecuencia del alelo heterocigoto aumenta considerablemente en la población, pudiendo llegar hasta el 1%¹⁰⁹.

Otro defecto genético muy común asociado a una moderada HHCY es la mutación puntual en la región

codificante del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Esta enzima está asociada a la remetilación de la HCY. La mutación genera una variante termolábil de la enzima que tiene disminuida su actividad en un 50%^{110,111}.

La insuficiencia renal o las deficiencias en vitaminas B requeridas por el metabolismo de la HCY, como el ácido fólico, la vitamina B₆ y/o la vitamina B₁₂, también son causa de HHCY^{112,113}. Se estima que una inadecuada ingesta de estas vitaminas es la responsable de 2/3 de todos los casos de HHCY^{114,115}. Aunque la deficiencia de folato y vitamina B₁₂ están relacionados con un aumento de la concentración de la HCY plasmática^{116,117}, la relación entre la HCY y los niveles de vitamina B₆ está menos clara¹¹⁸. Consecuentemente, los fármacos que interfieren en el metabolismo de estas vitaminas también pueden producir HHCY¹¹⁹⁻¹²¹. Además, se ha observado recientemente que un exceso de metionina en la dieta produce HHCY en los ratones⁶⁰.

También se han obtenido asociaciones entre los niveles de HCY y otros hábitos característicos que conforman nuestro estilo de vida. El estudio Hordaland es el primero a gran escala que refleja que el tabaco, el abundante consumo de café y la falta de ejercicio están asociados con concentraciones elevadas de HCY¹²²⁻¹²⁵. Los factores genéticos afectan mayoritariamente a los niveles de HCY de la población joven. Mientras que en los ancianos estos efectos tienen una repercusión considerablemente más pequeña que los introducidos por los factores nutricionales¹²⁶.

Fisiopatología

Hiperhomocisteinemia y disfunción endotelial

Como se ha comentado anteriormente, la HHCY es un factor de riesgo independiente en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares; sin embargo, los mecanismos de acción no son conocidos. La mayoría de los experimentos apoyan la hipótesis de que el exceso de HCY conlleva una disfunción endotelial y, como se ha observado anteriormente, esta disfunción sería crucial en la patogénesis y el desarrollo de la arteriosclerosis, tal como se resume en la [tabla 2](#). Dentro

Tabla 1 Etiología de la hiperhomocisteinemia

Origen genético	
Deficiencia de la cistationina betasintasa	
Deficiencia de la metilentetrahidrofolato reductasa	
Deficiencia en la absorción de vitamina B ₁₂	
Mutaciones de la metionina sintasa	
Origen adquirido	Deficiencia nutricional de piridoxina
Problemas nutricionales	
	Deficiencia de folatos
	Deficiencia de cobalamina
Defectos metabólicos	Insuficiencia renal crónica
	Administración de metionina oral
	Hipotiroidismo
Otros factores	Fármacos o drogas (metotrexato, fenitoína, carbamacepina, etc.)
—	Neoplasias
—	Trasplantes

Tabla 2 Resumen de los mecanismos propuestos para la acción de la homocisteína

<i>Arquitectura de los vasos</i>		<i>Estrés oxidativo</i>	↑
Daño endotelial	↑	Producción de peroxinitritos	↑
Proliferación de VSMC	↑	Enzimas oxidativas (SOD, GPx)	↑
Síntesis de colágeno y fibrosis de la media	↑	Peroxidación lipídica	↑
Restenosis vascular	↑	<i>Quimiotaxis, adhesión de leucocitos</i>	↑
Formación de células espumosas	↑	Adhesión de leucocitos	↑
Placas fibroproliferativas	↑	Presencia de ICAM-1, VCAM-1	↑
<i>Daño en estructura celular</i>	↑	Quimiotaxis (IL-8, MCP-1)	↑
Daños mitocondriales	↑	Activación de la coagulación	↑
Estrés del retículo endoplásmico	↑	Factor tisular	↑
Metaloproteinasas	↑	Inactivación de la proteína C	↑
Elastólisis	↑	Complejo trombina-antitrombina	↑
Expresión de HSP70	↓	D-Dímer	↑
<i>Disfunción endotelial</i>	↑	Fibrinólisis	↓
Sistema óxido nítrico (NO)	↓↑	Sulfato de heparina	↓
Biodisponibilidad de NO	↓	Anexina II	↓
ADMA	↑	Trombomodulina	↓
<i>Factores de transcripción</i>		Antígenos PAI-1, t-PA	↑
Activación de NF-κB, SREBP, PKC	↑	Fragmento de protrombina	↑
Expresión de los genes	↓↑	Inactivación del factor Va	↓
HMG-CoA reductasa	↑	Agregación trombocitaria	↑
Biosíntesis de lípidos	↑	Función de fibronectina	↓
Inactivación de PPAR alfa y gamma	↑	COX, producción de TXA, TXB	↑

ADMA: dimetilarginina asimétrica; COX: ciclooxigenasa; Gpx: glutatión peroxidasa; IL-8: interleucina 8; NO: óxido nítrico; SOD: superóxido dismutasa; t-PA: activador del plasminógeno tisular; TXA: tromboxano A; TXB: tromboxano B.

de esta disfunción se pueden destacar distintos mecanismos por los que la HHcy afectaría al endotelio.

Efecto sobre la vasodilatación

Diferentes estudios realizados tanto en humanos como en modelos animales han demostrado que la HHcy induce una deficiente vasodilatación de las arterias¹²⁷⁻¹²⁹. Esta alteración produce daños similares a los provocados por otros factores de riesgo, como la hipercolesterolemia y la hipertensión¹³⁰. Stamler et al demostraron que las propiedades vasodilatadoras de la célula endotelial se veían disminuidas por la HHcy debido principalmente a una reducción en la producción de óxido nítrico (NO)¹³¹. La inactivación del NO por la HHcy se ha observado en cultivos de células endoteliales e *in vivo*^{27,128}, y tiene lugar por una reducción de la expresión proteica de la eNOS y una disminución de su actividad por fosforilación en S1179¹³².

Algunas especies reactivas de hidrógeno, como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y los peroxinitritos, pueden contribuir a la inactivación del NO derivado del endotelio¹³³. Otro mecanismo que puede actuar en este sentido es la inhibición de la producción de NO causada por la dimetilarginina asimétrica (ADMA). La ADMA es un compuesto considerado como el inhibidor fisiológico de la NO sintasa y que se origina en la hidrólisis de proteínas metiladas. Se observan niveles plasmáticos elevados de ADMA en primates con HHcy^{134,135}. En pacientes sanos, los niveles de ADMA aumentan rápidamente después de una sobrecarga de metionina y se correlacionan con una alterada

vasodilatación dependiente del endotelio¹³⁶. Este acúmulo se produce por la inhibición de la enzima dimetilarginina dimetilamino hidrolasa responsable de la eliminación de la ADMA¹³⁷.

La HHcy también ejerce una acción directa sobre los miocitos, donde activa la metaloproteinasa 9 e induce permeabilidad mitocondrial y disfunción mecánica de este tipo de células. Se ha propuesto que esta acción podría estar mediada por una interacción de la HHcy con el receptor de N-metil-D-aspartato-1^{138,139} y ejercerse a través de la señalización del ácido epoxieicosatrienoico¹⁴⁰ y de las proteínas G¹⁴¹ e independiente de la NO sintasa inducible¹⁴².

Estrés oxidativo

Varias líneas de investigación sugieren que el incremento del estrés oxidativo y de los niveles de especies reactivas de oxígeno desempeñan un papel importante en los cambios vasculares producidos en una situación de HHcy^{128,143,144}. La primera hipótesis que surge de estas observaciones es que la HHcy autooxida su grupo tiol altamente reactivo y, a su vez, forma especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, esta hipótesis no puede explicar cómo la cisteína, que se encuentra en cantidades superiores a la HHcy y también se puede autooxidar, no causa daño endotelial y no es considerada como factor de riesgo en las enfermedades cardiovasculares.

El estrés oxidativo generado por la HHcy puede afectar a la aterogénesis por mecanismos distintos a la autooxidación; por ejemplo, un exceso de HHcy puede reaccionar con el NO

para formar la S-nitrosohomocisteína, impidiendo así una correcta respuesta del endotelio. También se ha descrito que la HHcy produce un descenso de la expresión de la glutatión peroxidasa (GPx), lo que impediría la inactivación del ión superóxido, de forma que ese ión podría reaccionar con el NO y formar peroxinitrito. La consecuencia, igualmente, sería la menor disponibilidad del NO para la vasodilatación¹⁴⁵.

Otro dato para tener en cuenta es que la Hcy puede incrementar el estrés oxidativo inhibiendo la expresión de la enzima superóxido dismutasa, produciendo de esta manera un aumento del anión superóxido y de los peroxinitritos^{98,146}. Tanto el anión superóxido como los peroxinitritos contribuyen a la generación de peróxidos lipídicos¹⁴⁷ y a la modificación de proteínas mediante la nitración del aminoácido tirosina. El peroxinitrito puede ejercer varios efectos; el primero es la nitración en tirosina de la prostaciclina sintasa y la superóxido dismutasa, la isoforma principal en la mitocondria, además de la activación de la poli-ADP ribosa polimerasa, importantes mediadores de la disfunción vascular¹⁴⁸. La inhibición de esta enzima atenúa el desarrollo aterosclerótico inducido por la HHcy a través de la inhibición del NF- κ B¹⁴⁹. También puede impedir la función endotelial oxidando el cofactor de la eNOS, la tetrahidrobiopterina, produciendo de esta manera una disminución en su actividad y/o el desacoplamiento de la enzima¹⁵⁰. En este sentido, existen resultados que indican que la expresión y la actividad de la GPx y de la HO-1 están disminuidas en cultivos de células del endotelio vascular en situación de HHcy, lo que sugiere que la Hcy puede inhibir el potencial antioxidante de las células¹⁵¹. Además, cuando al ratón deficiente en GPx-1 se le provocó una HHcy moderada con dietas deficientes en folato, se confirmó que la disfunción endotelial anteriormente observada en ratones con HHcy moderada se exacerbaba con la deficiencia añadida de GPx-1¹⁵¹ y que la sobreexpresión de esta enzima en animales carentes de una copia del gen CBS recuperaba la disfunción²⁷. Ambos resultados apuntan inequívocamente al papel de los peróxidos en el desarrollo de la disfunción endotelial ocasionada por la HHcy.

Esta generación de radicales libres podría incrementar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y, por lo tanto, su captación por parte de los macrófagos en la pared vascular¹⁵². Más recientemente se han obtenido resultados que apoyan esta hipótesis; Nakano et al observaron la oxidación de LDL humanas mediada por la Hcy. Las LDL oxidadas mediante este procedimiento son capturadas rápidamente por los macrófagos a través de la activación del receptor *scavenger*. Estos resultados indican que la salida continua de Hcy desde las células endoteliales contribuye a la modificación de las LDL y a su incorporación al macrófago, un paso muy importante en el desarrollo de la arteriosclerosis¹⁵³.

Inflamación

Se ha puesto de manifiesto que en una situación de HHcy se induce la producción de diversas moléculas proinflamatorias. En este sentido, se ha demostrado que el tratamiento de células del endotelio vascular, de células del músculo liso y de monocitos con Hcy induce la expresión de MCP-1, IL-8,

VCAM-1, Selectina E¹⁵⁴ y CXCL16 y de su receptor CXCR6¹⁵⁵. MCP-1 aumenta la unión de los monocitos al endotelio y su reclutamiento hacia el espacio subendotelial, un paso crítico en el desarrollo de la lesión aterosclerótica. Además, la inducción de IL-8 y MCP-1 se produce a través de la activación de NF- κ B, un factor de transcripción que estimula la producción de citoquinas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento que, a su vez, contribuyen a la inflamación vascular¹⁵⁶. Por último, la Hcy incrementa la expresión de TNF- α que conlleva una estimulación de otros genes inflamatorios y la inhibición de la vasoconstricción con la consiguiente alteración de la función endotelial¹⁵⁷. La Hcy promueve el estrés oxidativo en monocitos a través de la NAD(P)H oxidasa¹⁵⁸, la disminución del glutatión¹⁵⁹ o alteraciones en la tioredoxina¹⁶⁰.

Coagulación

La función del endotelio en el control de la coagulación ha sido abordada mediante cultivos celulares. Así, Rodgers et al demostraron que las células endoteliales en presencia de Hcy aumentan la expresión del factor v y la activación de la protrombina, lo que favorecería un estatus procoagulante¹⁶¹. Por otra parte, la Hcy inhibe también importantes vías fisiológicas anticoagulantes, como son la activación de la proteína C y la expresión de la trombomodulina en la superficie endotelial^{162,163}. Además, se han encontrado alteraciones en la unión con la antitrombina iii¹⁶⁴ y la reducción de la unión del activador tisular del plasminógeno a su receptor endotelial¹⁶⁵, un aumento en la secreción del factor Von Willebrand¹⁶⁶ y un incremento de la expresión del factor tisular por parte del endotelio expuesto a la Hcy¹⁶⁷. Por último, se ha observado que en conejos con HHcy inducida se producen coágulos anormalmente resistentes a la fibrinólisis que podrían contribuir directamente al proceso de trombosis¹⁶⁸ y, mediante inhibición de la fibrinólisis, impedir la migración de células endoteliales¹⁶⁹.

Otros mecanismos implicados

Aunque los recientes trabajos experimentales se centran en el NO y el estrés oxidativo, hay que poner de manifiesto que la Hcy tiene otras acciones que pueden alterar el endotelio. La Hcy produce la hipometilación del DNA¹⁷⁰ y altera la regulación por metilación de proteínas como Ras¹⁷¹. Igualmente, se ha propuesto un estrés del retículo¹⁷²⁻¹⁷⁴; sin embargo, nuevos estudios parecen sugerir que este fenómeno sería una consecuencia más que un efecto directo¹⁷⁵. Además, se ha descubierto que participa como aminoácido proteinogénico al ser la S-NO-Hcy análoga a la metionina e incorporarse al tARN^{met}. La incorporación de estos residuos en diferentes proteínas podría inducir un grave daño en las células^{176,177} y es un hallazgo corroborado tanto en humanos como en ratones^{178,179}. La Hcy induce también la proliferación de las células musculares lisas y disminuye la síntesis del DNA endotelial^{180,181}. Todos estos efectos pueden desembocar en una alteración de la actividad vascular y, en última instancia, en la activación de muerte celular en el endotelio¹⁸².

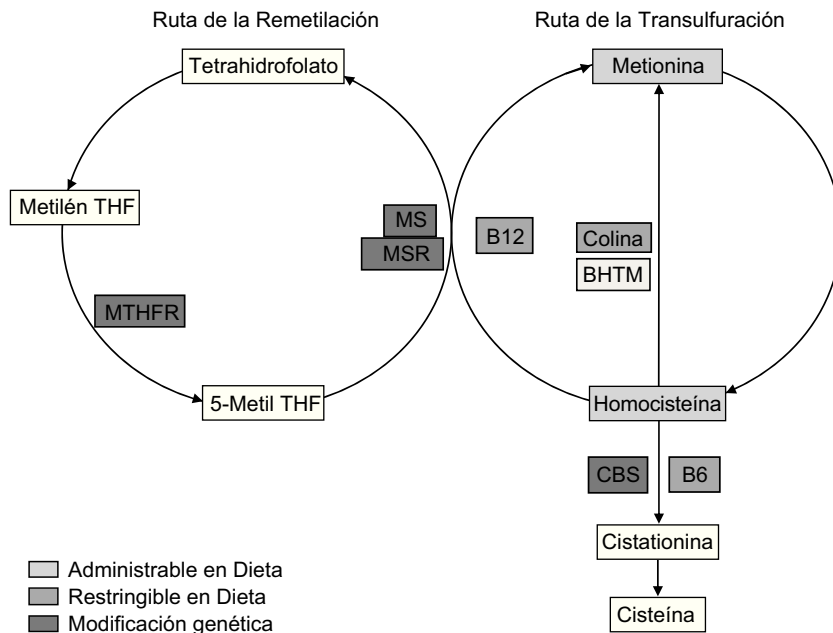


Figura 3 Estrategias de modificación del metabolismo de la homocisteína para lograr hiperhomocisteinemia. BHMT: betaína homocisteína metiltransferasa; CBS: cistationina betasintasa; Metil THF: metiltetrahidrofolato; Metilén THF: metilentetrahidrofolato; MS: metionina sintasa; MSR: metionina sintasa reductasa; MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa; SAH: S-adenosil homocisteína hidrolasa; SAM: S-adenosil metionina; SAMMT: S-metil metionina metiltransferasa; THF: tetrahidrofolato.

Modelos animales de hiperhomocisteinemia

Dada la relevancia de la elevación de la HCY en la patología y la necesidad de profundizar cada vez más en los mecanismos, se hacen necesarios nuevos desarrollos experimentales más rigurosos y eficaces para avanzar en el conocimiento. En este sentido, el ratón es un instrumento muy valioso debido a la variedad de modelos modificados genéticamente disponibles, su facilidad de manejo, el desarrollo de técnicas de alta sensibilidad muy útiles para muestras pequeñas y las consideraciones económicas, que hacen del ratón el modelo animal más utilizado.

Las estrategias posibles para generar HHcy quedan reflejadas en la [figura 3](#) y se enfocan a reducir la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo tanto nutricional como genéticamente, tal como desarrollamos a continuación.

Inducción de hiperhomocisteinemia mediante dieta en ratones

Las [tablas 3 y 4](#) recogen algunas de las estrategias llevadas a cabo *in vivo* con ratones de diferentes estirpes presentes en la naturaleza. La elevación de HCY en el plasma se puede inducir a través de varias vías: la más agresiva sería el aumento de metionina hasta alcanzar los 25 g/kg y la disminución de los aportes de folato, vitamina B₁₂, B₆ y colina en la dieta^{174,183}. La cepa de ratón C57BL/6J responde a estas dietas de forma bastante más acusada cuando se compara con la raza BALB/c. Tras un incremento inicial, se observó que las concentraciones de HCY en el plasma disminuían. En algunos casos, estos experimentos se han prolongado hasta un año y con este tipo de dietas se

consiguieron niveles de HCY en el plasma superiores a 240 µmol/L, lo que se aproxima mucho a los niveles que se pueden obtener trabajando con animales modificados genéticamente. Es de destacar que en animales alimentados con pienso alto en metionina y bajo en folato durante 8 meses se han observado alteraciones como esteatosis hepática y niveles de metionina en el plasma elevados, efectos que podrían alterar los resultados de los estudios. Esto podría ser explicado porque esas cantidades de metionina en el pienso son tóxicas y, además, pueden ocasionar retrasos en el crecimiento.

En el caso de los ratones modificados genéticamente, se han utilizado los deficientes en ApoE ([tabla 5](#)) a los que se les indujo HHcy mediante el aporte extra de metionina en la dieta y la eliminación de las vitaminas B₁₂, B₆ y ácido fólico. Con este enfoque experimental, Hofmann et al encontraron que la HHcy inducía un incremento en la expresión y actividad de factores clave en procesos inflamatorios, aterogénesis y vulnerabilidad de las placas aterogénicas, tales como la molécula de adhesión de células vasculares, el factor tisular y la metaloproteínasa 9⁵⁸.

Estos efectos revertían si se eliminaba la HHcy. También se observa un aumento de tres factores de transcripción (SREBP-2, CREB y NF-κB) en el hígado de ratas con HHcy inducida en la dieta. Estos efectos se asocian al incremento de la actividad de la hidroximetil glutaril coenzima A reductasa que conlleva el acúmulo de lípidos en el hígado¹⁸⁴. Trabajos más recientes han suscitado controversia sobre este enfoque, ya que la HHcy inducida por aporte de metionina en la dieta no contribuyó a la progresión de la aterosclerosis en ratones carentes de ApoE¹⁸⁵. Un efecto que también ha sido observado en ratones C57BL/6¹⁸⁶ a pesar de los cambios proinflamatorios y el aumento de lípidos plasmáticos.

Tabla 3 Estrategias dietéticas utilizadas en ratones de la cepa C57BL/6J y las concentraciones de homocisteína total conseguidas en plasma. Adaptada de (224)

HCY plasmática (μmol/l)	Principales cambios introducidos en la dieta	Metionina (g/kg)	Folato (mg/kg)	Vit. B ₁₂ (ug/kg)	Vit. B ₆ (mg/kg)	Colina (mmol/kg)	Referencias
282 ± 90	Muy alta en metionina	25	1,5	25	7	14	174,183
126 ± 76	Alta en metionina y alta en vit. B ₁₂	13 ± 2	1,5	91	17	21	179,132
69 ± 6	Muy alta en metionina y baja en colina	24	2	30	22	3,5	169
60 ± 61	Estándar, con niveles bajos de folato y con metionina a 5 g/l en el agua	4	1,5	91	17	21	174
41 ± 19	Alta en metionina	20	2 ± 2	33 ± 30	11 ± 6	21 ± 4	57,225
35 ± 29	Restringida en folato, Vit. B ₁₂ y Vit. B ₆	3	0,1	1,8	0,2	17 ± 6	226
22 ± 10	Alta en metionina, restringida en folato y niveles bajos de colina	8	0,2	91	17	2	49,209,227,228
19 ± 1	Restringida en folato	4	0,3	91	17	21	217
18 ± 2	Estándar con 1,8 g/l de DL-HCY en el agua	4 ± 1	4 ± 3	57 ± 33	13 ± 5	17 ± 6	105,160
16 ± 8	Estándar con 5 g/l de metionina en el agua	4	7	91	17	21	53,151,186,49
16 ± 1	Baja en colina	4 ± 1	2 ± 1	57 ± 33	15 ± 9	4 ± 1	188,229,169
4 ± 2	Estándar	4 ± 1	4 ± 3	57 ± 33	13 ± 5	17 ± 6	53,57,105,132,142,160,179,186,207,213,219,226,228,230,51,227,50,53

HCY: homocisteína; Vit.: vitamina.

Otro posible tipo de intervención encaminado a lograr HHCY a través de la dieta se ha centrado en reducir únicamente las cantidades de folato y vitaminas B₁₂ y B₆, tal como se observa en la [tabla 3](#). Con este desarrollo experimental se podían obtener concentraciones de 10–20 μmol/l, lo que imita la situación crónica humana. Los resultados demostraron alteraciones en las arteriolas del cerebelo o en las mesentéricas, necesitándose estrategias más agresivas con concentraciones por encima de 20 μmol/l para conseguir lesiones en los vasos mayores, como la aorta o la carótida^{47,48,50}.

La última forma de inducir HHCY ha sido la adición de HCY directamente en el agua de bebida combinándola en algunos casos con dietas especiales carentes de las vitaminas implicadas en el metabolismo de metionina y HCY. En esta situación, los valores de hiperhomocisteína también fueron moderados ([tablas 3–5](#)).

La manipulación de la dieta durante largos periodos de tiempo permite modular la cantidad de HCY que se desea obtener en el plasma y así emular la situación crónica presente en pacientes humanos. Otra ventaja potencial de la inducción de HHCY por vía dietética sería la posibilidad de

trabajar con animales no transgénicos, con lo que se evitarían los problemas reproductivos que pueden presentar las diferentes líneas de ratones modificados genéticamente, comentados más adelante, y que condicionan los diseños experimentales. Por otro lado, este tipo de experimentación plantea una serie de inconvenientes: el primero, la toma de muestras, ya que se ha demostrado que los niveles de HCY son mucho mayores en animales recién alimentados que en los ayunados¹⁸⁷, por ello se han de controlar estrictamente los tiempos de ayuno y esto exige un gran esfuerzo y la utilización de jaulas metabólicas de última generación. Otro problema encontrado en los diversos estudios dietéticos se refiere al uso de piensos control semipurificados, cuya fuente de proteína (soja, maíz, caseína) puede variar en función de los vaivenes del mercado, por ello se hace cada vez más imperante el empleo de dietas purificadas cuya fuente de proteína sea constante. Por último, uno de tipo conceptual, ya que la mayor limitación del uso de dietas para inducir HHCY es que, al utilizar dietas deficientes en algunas sustancias esenciales, se podrían estar modificando las lesiones que observamos, de forma independiente de las que provoque la HCY *per se*.

Tabla 4 Estrategias dietéticas utilizadas para provocar hiperhomocisteinemia en otras razas de ratones

Línea de ratón	HCY plasmática (μmol/l)	Principales cambios introducidos en la dieta	Metionina (g/kg)	Folato (mg/kg)	Vit. B ₁₂ (ug/kg)	Vit. B ₆ (mg/kg)	Colina (mmol/kg)	Referencias
BALB/c	9 ± 2	Alta en metionina, restringida en folato y baja en Vit. B ₁₂ , B ₆ , y colina	8	0,2	25	8	8	50
BALB/c	11 ± 3	Restringida en folato	4	1	91	17	21	217
BALB/c	8 ± 3	Restringida en folato y baja en Vit. B ₁₂ , B ₆ , y colina	4	1	5	3	8	50
BALB/c	3 ± 1	Estándar	4	7	91	17	17	50
CD-1	102 ± 64	Estándar (añadiendo un 15 g/kg de DL-HCY en el pienso)	11	10	30	15	8	231
CD-1	3 ± 2	Estándar	11	10	30	15	8	231
FVB/NJ	113 ± 22	Sin metionina ni colina (añadiendo 1,8 g/l de DL-HCY en agua)	0	2	30	22	0	175
FVB/NJ	103 ± 17	Sin metionina ni colina	0	2	30	22	0	175
FVB/NJ	76 ± 26	Sin metionina ni colina (añadiendo 5 g/l de Metionina en agua)	0	2	30	22	0	175
FVB/NJ	43 ± 8	Estándar (añadiendo 1,8 g/l de DL-HCY en agua)	4	2	30	22	21	175
FVB/NJ	14 ± 2	Estándar	4	2	30	22	21	175

HCY: homocisteína; Vit.: vitamina.

Tabla 5 Estrategias dietéticas utilizadas para modificar la homocisteinemia en ratones carentes de apolipoproteína E

HCY plasmática (μmol/l)	Principales cambios introducidos en la dieta	Metionina (g/kg)	Folato (mg/kg)	Vit. B ₁₂ (ug/kg)	Vit. B ₆ (mg/kg)	Colina (mmol/kg)	Referencias
243 ± 82	Restringida en folato, Vit. B ₁₂ y Vit. B ₆	3	0,1	1,8	0,2	10	60
87 ± 25	Alta en metionina y restringida en folato y Vit. B ₁₂	8	0,1	0,8	7	10	60
54 ± 9	Alta en metionina y baja en folato y colina	13	0,8	5	4	2	232
52 ± 3	Restringida en folato, Vit. B ₁₂ y colina. Además se añadió DL-homocisteína a 0,9 g/l en el agua	4	0,5	6	9	2	232
48 ± 84	Muy alta en metionina	21	5 ± 4	58 ± 47	12 ± 7	15 ± 8	149
34 ± 7	Estándar con DL-homocisteína a 0,9 g/l en el agua	3,7	3,2	55	15	21	233
25 ± 10	Estándar con metionina a 5 g/l añadida en el agua	4 ± 1	5 ± 4	58 ± 46	12 ± 7	15 ± 8	234
17 ± 2	Alta en metionina y baja en folato	10 ± 3	1 ± 1	25	8 ± 1	9 ± 1	59,235
8 ± 2	Estándar	4 ± 1	5 ± 4	58 ± 46	12 ± 7	15 ± 8	60,149,158, 233-235

HCY: homocisteína; Vit.: vitamina.

Inducción de hiperhomocisteinemia mediante tratamiento farmacológico en ratones

S-(δ-carboxilbutil)-DL-HCY es un inhibidor de la betaína HCY metiltransferasa que, inyectado intraperitonealmente durante tres días, provoca unos aumentos de HCY plasmáticas de hasta unos 18 μmol/l¹⁸⁸. Otro sistema utilizado es la implantación subcutánea en ratones de bombas osmóticas que liberen HCY de forma lenta y sostenida en el tiempo¹⁸⁹. Los inconvenientes de esta técnica son la necesidad de anestesia y el procedimiento

quirúrgico, y la ventaja es la posibilidad de controlar la HCY plasmática.

Modelos genéticos de hiperhomocisteinemia e hipohomocisteinemia

Al objeto de disponer de modelos animales con HHcy permanente, se han generado por ingeniería genética diversos ratones carentes de las enzimas MS, metionina sintasa reductasa, MTHFR y CBS.

Los ratones heterocigotos carentes del gen de la MS fueron moderadamente hiperhomocisteinémicos, en tanto que los embriones homocigotos murieron poco después de la implantación, lo que sugiere un papel crucial de esta enzima en el desarrollo embrionario de este animal¹⁹⁰. Mediante el empleo de estos animales se ha observado incapacidad de respuesta vascular y aumento de estrés oxidativo⁴⁸.

Los ratones homocigotos carentes de metionina sintasa reductasa, que es la enzima que cataliza la reducción de la MS, no poseen problemas de letalidad o de crecimiento, ya que no tienen totalmente perdida la actividad de esta enzima, sino que tienen disminuida su expresión génica entre un 1–37% comparados con un animal normal. Presentan una leve HHcy (18 μ mol/l frente a 5 μ mol/l del control) pero tienen la metionina elevada en un 30%¹⁹¹.

Los ratones carentes de la enzima MTHFR se generaron por dos grupos de manera independiente^{192,193}. La enzima MTHFR reduce este compuesto a 5-metiltetrahidrofolato, que se utiliza en la remetilación de la Hcy. El fallo de esta enzima es frecuente en la población, por lo que es interesante el estudio del animal carente de dicha enzima. Los ratones homocigotos deficientes en la enzima MTHFR presentaron unos niveles de Hcy 10 veces superiores a los controles, en tanto que la inactivación de la enzima en heterocigosis solo elevó dicho parámetro 1,6 veces el valor normal. Los animales homocigotos presentaron menor tamaño corporal y retraso del desarrollo, así como alteraciones patológicas en el cerebelo, en concreto, disminución de su tamaño y de la presencia de células granulosas, aunque no la neurogénesis¹⁹⁴. En estos animales, tanto en heterocigosis como en homocigosis, aunque a una edad avanzada, se observaron depósitos de lípidos en la aorta¹⁹². En este modelo animal se encontró igualmente una correlación negativa significativa entre la betaina plasmática y las concentraciones de Hcy. Se presentó, asimismo, una disminución en la concentración hepática de betaina, dimetilglicina y otros metabolitos de la colina, lo que sugiere que la disminución o la ausencia de la MTHFR alteran la homeostasis de la colina. Estos cambios metabólicos se reflejaron en una severa esteatosis hepática. El suplemento de betaina en la dieta mejoró la supervivencia y el crecimiento de los animales homocigotos, redujo la Hcy plasmática, aumentó la ApoA-I y revirtió algunos de los cambios patológicos observados, tales como las anomalías cerebelosas¹⁸⁸, la espermatogénesis defectuosa¹⁹⁵ y los acúmulos lipídicos del hígado y de la aorta¹⁹⁶. Estos resultados evidencian la extraordinaria sensibilidad de estos modelos a los cambios de betaina de la dieta.

En este mismo tipo de animales, también se observó una hipometilación del DNA así como un descenso de la S-adenosil metionina y un aumento de la S-adenosil Hcy que podrían explicar el efecto observado a nivel del DNA. La disminución de adenosina puede contribuir a los efectos cardiovasculares de la HHcy. *In vivo*, cualquier incremento de Hcy en el plasma refleja un incremento intracelular de Hcy que, inevitablemente, disminuye la adenosina debido a que se acumula la adenosil Hcy. De este modo se perdería la acción beneficiosa de la estimulación de los receptores de adenosina que produce varias acciones cardioprotectoras, la vasodilatación¹⁹⁷, la inhibición de la agregación plaquetaria¹⁹⁸, la modulación de la inflamación y la regulación vascular de la proliferación y la muerte celular^{50,199,200}.

El primer modelo genético de HHcy, creado en 1995 por el grupo de Maeda, fue el ratón carente de la enzima CBS⁷¹. Los ratones carentes de esta enzima presentaron una HHcy muy severa y completaron el desarrollo embrionario normalmente⁷¹. Los animales neonatos presentan alteraciones del crecimiento reflejadas en un retraso de la apertura del ojo y anomalías esqueléticas tales como la cara, la cola y las extremidades muy alargadas y delgadas. El 80% de estos ratones muere hacia el día 21 de su nacimiento. Las investigaciones de las anomalías morfológicas revelan que estos ratones poseen la piel arrugada, la dermis y la hipodermis muy finas y sufren de hiperqueratosis de la epidermis. El pelo en el lomo es menos denso y con menor diámetro que los animales control. Estos resultados demuestran que las anomalías cutáneas observadas en el ratón deficiente en CBS se asemejan a las encontradas en humanos y que están relacionadas con la homeostasis de la matriz extracelular⁹¹. Recientemente, se ha observado que en estos animales existe un acortamiento de los huesos largos debido a una diferenciación deficiente en el cartílago²⁰¹. El aporte de betaina a ratones heterocigotos del gen de CBS redujo la concentración de Hcy¹⁸⁸ a pesar de que, en este caso, el suplemento de cisteína resulta especialmente crítico para su supervivencia²⁰². En este tipo de animales, el aporte de vino tinto redujo los niveles de Hcy y mejoró los parámetros de función endotelial²⁰³.

Un importante hallazgo fue la histopatología hepática. Los hepatocitos eran de mayor tamaño del normal, multinucleados o binucleados y con inclusiones lipídicas intracitoplasmáticas. El análisis de lípidos reveló acúmulo de colesterol y triglicéridos en este órgano, en consonancia con los hallazgos histopatológicos. En el origen de dicho problema se postuló una exacerbada captación de lípidos plasmáticos por una desregulación de la ruta de respuesta a esteroides a consecuencia del estrés del retículo endoplásmico¹⁷⁴. La HHcy severa de este modelo también se acompañó de hipometilación del DNA y elevación de la S-adenosil Hcy en el hígado²⁰⁴. Igualmente, los machos que sobrevivieron fueron fértiles, mientras que las hembras no lo fueron⁷¹. En la investigación de las causas se comprobó que no se debía a problemas directamente del feto porque se obtenían animales homocigotos vivos nacidos de hembras heterocigotas. Por el contrario, las hembras homocigotas carentes del gen no llegaban a parir crías vivas, debiéndose a un problema en el útero, demostrado al realizar trasplantes de ovarios de hembras homocigotas carentes de CBS a receptoras normales que se cruzaron con machos homocigotos. Estas receptoras, en cambio, fueron capaces de parir animales vivos homocigotos carentes del gen⁷².

Al estudiar la expresión de los genes hepáticos de ratones deficientes en CBS, se observan cambios en genes implicados en la proliferación y en el crecimiento celular. También están alterados algunos genes del estrés oxidativo, por ejemplo, se sobreexpresa la HO-1 y disminuye la expresión de la paraoxonasa²⁰⁵. Recientemente se ha demostrado que la HHcy severa promueve en el hígado estrés oxidativo, que puede causar daño mitocondrial en asociación con la activación de células hepáticas esteladas²⁰⁶. Sin embargo, existen señales protectoras que contrarrestan las señales apoptóticas en el hígado de estos ratones, tales como el aumento de la actividad catalasa²⁰⁷ y de la activación de la degradación del inhibidor κ B por la calpaína²⁰⁸. Otros estudios en el hígado demuestran que los ratones deficientes

en CBS tienen alterada la homeostasis redox con niveles de glutatión y cisteína reducidos. Por el contrario, los heterocigotos solo presentan mínimos cambios en el estado redox y no muestran ninguna desventaja frente a los controles²⁰⁹.

En los cerebros de los ratones deficientes en CBS, algunos genes de la vía de las quinasas SAPK/JNK se encuentran alterados. Investigando la activación de proteínas involucradas en esta cascada, se ha demostrado que JNK y c-Jun están activadas en neuronas del hipocampo, sugiriendo que esta vía puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de defectos neuronales asociados a la HHcy⁹¹.

En estos modelos de HHcy, la modificación dietética también permite manipular la intensidad de esta, tal como se recoge en la [tabla 6](#) para los ratones heterocigotos carentes de CBS y MTHFR. Con excepción de la dieta en la que se redujo el folato, los niveles de HHcy fueron más elevados en los ratones carentes de la enzima CBS.

Un modelo genético de hipohomocisteinemia se encontró al inactivar el gen de la fosfatidil etanolamina N-metiltransferasa ya que, al no metilarse este fosfolípido, no se emplea la S-adenosil metionina y no se genera en el hígado la suficiente S-adenosil Hcy para producir Hcy. Los animales carentes de la enzima presentan esteatosis hepática²¹⁰. Esto puede deberse a que existe una disminución de la actividad lecitina: colesterol aciltransferasa, lo que puede causar una maduración defectuosa de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), al igual que la disminución de la betaoxidación de ácidos grasos está disminuida por defecto de la tiolasa²¹¹.

La sobreexpresión de la proteína Dyrk-1a aumenta la actividad de la S-adenosil Hcy hidrolasa y disminuye los niveles de Hcy²¹². A su vez, la Hcy regula los niveles de la proteína Dyrk-1a a través de la acción de la calpaína²¹³. Otro

modelo de hipohomocisteinemia se presenta en los ratones carentes del PGC-1 α ²¹⁴. Todos estos mecanismos de control apuntan hacia nuevas vías de regulación de la Hcy.

Modelos combinados de hiperhomocisteinemia y otros factores de riesgo

La disponibilidad de estos modelos modificados genéticamente abre un nuevo abanico de posibilidades para explorar la combinación de factores de riesgo al objeto de determinar la participación de la HHcy en otros entornos fenotípicos.

El grupo de Wang et al generó ratones dobles deficientes para los genes de CBS y de ApoE. Al analizar su fenotipo, encontraron una arteriosclerosis más pronunciada que la encontrada en los ratones únicamente deficientes para el gen de la ApoE²¹⁵. También observaron que la existencia de HHcy inducía un aumento en la captación de las LDL acetiladas por los macrófagos y una disminución de las HDL, que podrían estar facilitando el mayor acúmulo de colesterol y triglicéridos en la pared del vaso²¹⁶. En el caso del doble mutante heterocigoto para MTHFR y homocigoto para ApoE, la presencia de la deficiencia de MTHFR aumentó el acúmulo de lípidos y la hipertrigliceridemia se asoció con los niveles de Hcy plasmática²¹⁷.

Se han generado ratones carentes de CBS que sobreexpresan la proteína humana normal bajo el control de un promotor inducible por zinc. En presencia de zinc, aumenta la actividad de la enzima de dos a cuatro veces con el consiguiente descenso de la Hcy en el plasma. De esta manera, consiguen un buen mecanismo para rescatar a los

Tabla 6 Modificación de la hiperhomocisteinemia en animales heterocigotos para cistationina betasintasa y metilente-tetrahidrofolato reductasa mediante el uso de diferentes dietas

Sustrato	Genotipo	Hcy plasmática ($\mu\text{mol/l}$)	Principales cambios en la dieta	Metionina (g/kg)	Folato (mg/kg)	Referencias
C57BL/6J	CBS	140 ± 51	Muy alta en metionina y baja en folato	20	3	230
C57BL/6J	MTHFR	9 ± 3				51
C57BL/6J	CBS	63 ± 27	Alta en metionina y restringida en folato	8	0,2	49,227,228
BALB/c	MTHFR	18 ± 3				50
C57BL/6J	CBS	37 ± 11	Estándar, con 5 g/l de metionina en agua	4	7 ± 1	47,51,213,227,236
BALB/c	MTHFR	7 ± 1				50
C57BL/6J	MTHFR	39 ± 2	Con folato restringido	4	0,3	217
BALB/c	MTHFR	27 ± 15	4	0,2		50,217
C57BL/6J	CBS	9 ± 1	5	1		207,208,213
C57BL/6J	MTHFR	23 ± 1	Baja en folato	4	2	217
BALB/c	MTHFR	12 ± 1				217
C57BL/6J	CBS	10 ± 3	Estándar	4	7 ± 1	47,49,51,142,208,22
BALB/c	MTHFR	5 ± 1				50

CBS: cistationina betasintasa; Hcy: homocisteína; MTHFR: metilente-tetrahidrofolato reductasa.

neonatos carentes de CBS que sufren una alta letalidad¹⁸³. Este mismo grupo ha generado dos nuevos ratones transgénicos que expresan las variantes I278T y T424N de la CBS humana; en estos casos, se observó de nuevo un descenso notable en la mortalidad de los homocigotos pero sorprendentemente no se observa una disminución concomitante de los niveles de HCY. Como hipótesis, estos autores proponen que la enzima CBS puede tener otra función distinta a la que conocemos dentro del catabolismo de la HCY²¹⁸. Más recientemente, otro grupo ha generado ratones carentes de CBS que sobreexpresan la proteína humana normal o la variante I278T, dos modelos animales con niveles séricos de HCY de 169 y de 296 $\mu\text{mol/l}$, respectivamente. Solo el último grupo de ratones presentó alopecia, osteoporosis, estrés del retículo en el hígado y el riñón, reducción de la supervivencia, elevación de HCY oxidada plasmática y aumento de S-adenosil HCY hepática. Estos modelos sugieren la existencia de un umbral de HCY para producir el efecto patológico²¹⁹. Con un desarrollo similar de nuevos modelos, en este caso con ratones carentes de CBS que sobreexpresan la variante de proteína humana S466L, se demostró *in vivo* que esta forma enzimática era inestable y su actividad enzimática era ineficiente, lo que originó homocistinuria²²⁰.

La sobreexpresión de la GPx-1 en animales heterocigotos carentes de una copia del gen CBS recuperaba la disfunción endotelial²⁷. Este resultado apunta inequívocamente al papel de los peróxidos en el desarrollo de la disfunción endotelial ocasionada por la HHcy.

Nuestro grupo ha investigado la combinación de la HHcy junto con la hipoalfalipoproteinemia moderada mediante la generación del ratón carente de los genes CBS y ApoA-1. Nuestros resultados muestran que la presencia simultánea de HCY elevada y de niveles bajos de colesterol HDL es un factor temprano de desarrollo de hipertensión arterial al inducir hipertrofia ventricular izquierda y que en el proceso está implicada la menor producción de NO²²¹. Igualmente, la presentación fenotípica es muy variable dependiendo de la raza de ratones empleada, ya que depende también de la expresión de los genes codificantes para proteínas contráctiles²²². Utilizando este mismo modelo, hemos demostrado que la simvastatina puede controlar esta hipertensión al restaurar la producción de NO^{223,224}.

Conclusión

La HCY es un aminoácido cuya elevación sanguínea aparece implicada en múltiples patologías. Sus niveles muestran una enorme variabilidad en función de la raza, el sexo, la edad y otros factores ambientales. En este sentido, el tipo de dieta puede ejercer un papel muy importante y es un factor poco abordado.

El empleo del ratón como modelo experimental en este campo está permitiendo que el progreso de las dietas que influyen en estas patologías haya sido notable. Esto, unido al desarrollo de animales modificados genéticamente con HHcy, está permitiendo caracterizar los mecanismos moleculares implicados en la acción *in vivo* de la HCY. Además, la combinación de estos modelos con otros modificados genéticamente permite definir la influencia de la combinación de factores de riesgo en el desarrollo de diversas

patologías y contribuir así a explicar muchas de las evidencias epidemiológicas en humanos.

Financiación

El trabajo llevado a cabo por este equipo está financiado, en parte, por los proyectos CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III, CICYT-FEDER (SAF2007-60173), Gobierno de Aragón (PI025/08) y Redes DGA (B-69). M.A.N. y R.C. han sido financiados por un contrato Miguel Servet y por una beca del Gobierno de Aragón, respectivamente.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Rees MM, Rodgers GM. Homocysteinemia: Association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis. *Thromb Res*. 1993;71:337–59.
2. Smilde TJ, van den Bergmolen FW, Boers GH, Wollersheim H, de Boo T, van Langen H, et al. Carotid and femoral artery wall thickness and stiffness in patients at risk for cardiovascular disease, with special emphasis on hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1958–63.
3. Gupta M, Sharma P, Garg G, Kaur K, Bedi GK, Vij A. Plasma homocysteine: An independent or an interactive risk factor for coronary artery disease. *Clin Chim Acta*. 2005;352:121–5.
4. Zhou J, Austin RC. Contributions of hyperhomocysteinemia to atherosclerosis: Causal relationship and potential mechanisms. *Biofactors*. 2009;35:120–9.
5. Bertomeu V, Castillo-Castillo J. Situación de la enfermedad cardiovascular en España. *Rev Esp Cardiol*. 2008;8:2E–9E.
6. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97:1837–47.
7. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: Implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol*. 1969;56:111–28.
8. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet*. 1985;37:1–31.
9. Yap S, Boers GH, Wilcken B, Wilcken DE, Brenton DP, Lee PJ, et al. Vascular outcome in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency treated chronically: A multicenter observational study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:2080–5.
10. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:217–46.
11. Eikelboom JW, Lonn E, Genest Jr J, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: A critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med*. 1999;131:363–75.
12. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: Pathways and regulation. *Eur J Pediatr*. 1998;157:S40–4.
13. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet*. 1999;354:407–13.
14. Singh S, Padovani D, Leslie RA, Chiku T, Banerjee R. Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *J Biol Chem*. 2009;284:22457–66.
15. Shintani T, Iwabuchi T, Soga T, Kato Y, Yamamoto T, Takano N, et al. Cystathionine beta-synthase as a carbon monoxide-sensitive regulator of bile excretion. *Hepatology*. 2009;49:141–50.

16. Chiku T, Padovani D, Zhu W, Singh S, Vitvitsky V, Banerjee R. H₂S biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem.* 2009;284:11601–12.
17. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet.* 2001;38:285–303.
18. D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. *Blood.* 1997;90:1–11.
19. Kang SS, Wong PW, Bock HG, Horwitz A, Grix A. Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase mutations. *Am J Hum Genet.* 1991;48:546–51.
20. Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: An inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet.* 1991;48:536–45.
21. Szegedi SS, Castro CC, Koutmos M, Garrow TA. Betaine-homocysteine S-methyltransferase-2 is an S-methylmethionine-homocysteine methyltransferase. *J Biol Chem.* 2008;283:8939–45.
22. Jakubowski H. Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem.* 2002;277:30425–8.
23. Ueland PM. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem.* 1995;41:340–2.
24. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem.* 1985;31:624–8.
25. Chace DH, Hillman SL, Millington DS, Kahler SG, Adam BW, Levy HL. Rapid diagnosis of homocystinuria and other hypermethioninemias from newborns' blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 1996;42:349–55.
26. Chadefaux B, Coude M, Hamet M, Aupetit J, Kamoun P. Rapid determination of total homocysteine in plasma. *Clin Chem.* 1989;35:2002.
27. Weiss N, Heydrick S, Zhang YY, Bierl C, Cap A, Loscalzo J. Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:34–41.
28. Malinow MR, Axthelm MK, Meredith MJ, MacDonald NA, Upson BM. Synthesis and transsulfuration of homocysteine in blood. *J Lab Clin Med.* 1994;123:421–9.
29. Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. *Eur J Clin Invest.* 1992;22:79–87.
30. Refsum H, Nygard O, Kvale G, Ueland PM, Vollset SE. The Hordaland homocysteine study: The opposite tails odds ratios reveal differential effects of gender and intake of vitamin supplements at high and low plasma total homocysteine concentrations. *J Nutr.* 1996;126:1244S–8S.
31. Wouters MG, Moorrees MT, Van der Mooren MJ, Blom HJ, Boers GH, Schellekens LA, et al. Plasma homocysteine and menopausal status. *Eur J Clin Invest.* 1995;25:801–5.
32. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, et al. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med.* 1995;332:286–91.
33. Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, Selhub J, Davignon J, Genest Jr J. Plasma total homocysteine in healthy subjects: Sex-specific relation with biological traits. *Am J Clin Nutr.* 1996;64:587–93.
34. Robinson K, Gupta A, Dennis V, Arheart K, Chaudhary D, Green R, et al. Hyperhomocysteinemia confers an independent increased risk of atherosclerosis in end-stage renal disease and is closely linked to plasma folate and pyridoxine concentrations. *Circulation.* 1996;94:2743–8.
35. Ubbink JB, Vermaak WJ, Delpont R, Van der Merwe A, Becker PJ, Potgieter H. Effective homocysteine metabolism may protect South African blacks against coronary heart disease. *Am J Clin Nutr.* 1995;62:802–8.
36. Lolin YI, Sanderson JE, Cheng SK, Chan CF, Pang CP, Woo KS, et al. Hyperhomocysteinemia and premature coronary artery disease in the Chinese. *Heart.* 1996;76:117–22.
37. Refsum H, Fiskerstrand T, Guttormsen AB, Ueland PM. Assessment of homocysteine status. *J Inher Metab Dis.* 1997;20:286–94.
38. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA.* 1995;274:1049–57.
39. Robinson K, Mayer EL, Miller DP, Green R, Van Lente F, Gupta A, et al. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation.* 1995;92:2825–30.
40. Chasan-Taber L, Selhub J, Rosenberg IH, Malinow MR, Terry P, Tishler PV, et al. A prospective study of folate and vitamin B6 and risk of myocardial infarction in US physicians. *J Am Coll Nutr.* 1996;15:136–43.
41. Iso H, Moriyama Y, Sato S, Kitamura A, Tanigawa T, Yamagishi K, et al. Serum total homocysteine concentrations and risk of stroke and its subtypes in Japanese. *Circulation.* 2004;109:2766–72.
42. van den Berg M, Stehouwer CD, Bierdrager E, Rauwerda JA. Plasma homocysteine and severity of atherosclerosis in young patients with lower-limb atherosclerotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:165–71.
43. Boers GH. Hyperhomocysteinemia: A newly recognized risk factor for vascular disease. *Neth J Med.* 1994;45:34–41.
44. Den Heijer M, Keijzer MB. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thrombosis. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39:710–3.
45. Rasouli ML, Nasir K, Blumenthal RS, Park R, Aziz DC, Budoff MJ. Plasma homocysteine predicts progression of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2005;181:159–65.
46. Méndez-González J, Rodríguez-Millán E, Julve J, Blanco-Vaca F. Tratamientos vitamínicos para disminuir la concentración de homocisteína: ¿reducen el riesgo de enfermedad cerebrovascular en prevención primaria? *Rev Neurol.* 2010;50:235–44.
47. Dayal S, Arning E, Bottiglieri T, Boger RH, Sigmund CD, Faraci FM, et al. Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke.* 2004;35:1957–62.
48. Dayal S, Devlin AM, McCaw RB, Liu ML, Arning E, Bottiglieri T, et al. Cerebral vascular dysfunction in methionine synthase-deficient mice. *Circulation.* 2005;112:737–44.
49. Dayal S, Wilson KM, Leo L, Arning E, Bottiglieri T, Lentz SR. Enhanced susceptibility to arterial thrombosis in a murine model of hyperhomocysteinemia. *Blood.* 2006;108:2237–43.
50. Devlin AM, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Rozen R, Lentz SR. Effect of Mthfr genotype on diet-induced hyperhomocysteinemia and vascular function in mice. *Blood.* 2004;103:2624–9.
51. Dayal S, Bottiglieri T, Arning E, Maeda N, Malinow MR, Sigmund CD, et al. Endothelial dysfunction and elevation of S-adenosylhomocysteine in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circ Res.* 2001;88:1203–9.
52. Lentz SR, Erger RA, Dayal S, Maeda N, Malinow MR, Heistad DD, et al. Folate dependence of hyperhomocysteinemia and vascular dysfunction in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H970–5.
53. Baumbach GL, Sigmund CD, Bottiglieri T, Lentz SR. Structure of cerebral arterioles in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circ Res.* 2002;91:931–7.
54. Mullick AE, Zaid UB, Athanassious CN, Lentz SR, Rutledge JC, Symons JD. Hyperhomocysteinemia increases arterial permeability and stiffness in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;291:R1349–54.

55. Ovechkin AV, Tyagi N, Sen U, Lominadze D, Steed MM, Moshal KS, et al. 3-Deazaadenosine mitigates arterial remodeling and hypertension in hyperhomocysteinemic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291:L905–11.
56. Symons JD, Zaid UB, Athanassious CN, Mullick AE, Lentz SR, Rutledge JC. Influence of folate on arterial permeability and stiffness in the absence or presence of hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:814–8.
57. Tan H, Jiang X, Yang F, Li Z, Liao D, Trial J, et al. Hyperhomocysteinemia inhibits post-injury reendothelialization in mice. *Cardiovasc Res*. 2006;69:253–62.
58. Westrick RJ, Winn ME, Eitzman DT. Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2079–93.
59. Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, et al. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest*. 2001;107:675–83.
60. Troen AM, Lutgens E, Smith DE, Rosenberg IH, Selhub J. The atherogenic effect of excess methionine intake. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:15089–94.
61. Hultberg B, Agardh E, Andersson A, Brattstrom L, Isaksson A, Israelsson B, et al. Increased levels of plasma homocysteine are associated with nephropathy, but not severe retinopathy in type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest*. 1991;51:277–82.
62. Brosnan JT, Hall B, Selhub J, Nadeau MR, Bostom AG. Renal metabolism of homocysteine in vivo. *Biochem Soc Trans*. 1995;23:470S.
63. Sen U, Basu P, Abe OA, Givvimani S, Tyagi N, Metreveli N, et al. Hydrogen sulfide ameliorates hyperhomocysteinemia-associated chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297:F410–9.
64. Tyagi N, Moshal KS, Sen U, Vacek TP, Kumar M, Hughes Jr WM, et al. H₂S protects against methionine-induced oxidative stress in brain endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:25–33.
65. Ueland PM, Nygard O, Vollset SE, Refsum H. The Hordaland Homocysteine Studies. *Lipids*. 2001;36:S33–9.
66. Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. *Placenta*. 1999;20:519–29.
67. Wang J, Trudinger BJ, Duarte N, Wilcken DE, Wang XL. Elevated circulating homocyst(e)ine levels in placental vascular disease and associated pre-eclampsia. *Bjog*. 2000;107:935–8.
68. Daly S, Cotter A, Molloy AE, Scott J. Homocysteine and folic acid: Implications for pregnancy. *Semin Vasc Med*. 2005;5:190–200.
69. VanAerts LA, Poirot CM, Herberts CA, Blom HJ, De Abreu RA, Trijbels JM, et al. Development of methionine synthase, cystathionine-beta-synthase and S-adenosyl-homocysteine hydrolase during gestation in rats. *J Reprod Fertil*. 1995;103:227–32.
70. Thompson HR, Jones GM, Narkewicz MR. Ontogeny of hepatic enzymes involved in serine- and folate-dependent one-carbon metabolism in rabbits. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;280:G873–8.
71. Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, et al. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: Animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:1585–9.
72. Guzmán MA, Navarro MA, Carnicer R, Sarriá AJ, Acín S, Arnal C, et al. Cystathionine beta-synthase is essential for female reproductive function. *Hum Mol Genet*. 2006;15:3168–76.
73. Riggs KM, Spiro 3rd A, Tucker K, Rush D. Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. *Am J Clin Nutr*. 1996;63:306–14.
74. Budge M, Johnston C, Hogervorst E, De Jager C, Milwain E, Iversen SD, et al. Plasma total homocysteine and cognitive performance in a volunteer elderly population. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;903:407–10.
75. Kado DM, Karlamangla AS, Huang MH, Troen A, Rowe JW, Selhub J, et al. Homocysteine versus the vitamins folate, B₆, and B₁₂ as predictors of cognitive function and decline in older high-functioning adults: MacArthur Studies of Successful Aging. *Am J Med*. 2005;118:161–7.
76. Brattstrom LE, Hardebo JE, Hultberg BL. Moderate homocysteinemia—a possible risk factor for arteriosclerotic cerebrovascular disease. *Stroke*. 1984;15:1012–6.
77. Yoo JH, Chung CS, Kang SS. Relation of plasma homocyst(e)ine to cerebral infarction and cerebral atherosclerosis. *Stroke*. 1998;29:2478–83.
78. Fassbender K, Mielke O, Bertsch T, Nafe B, Froschen S, Hennerici M. Homocysteine in cerebral macroangiography and microangiopathy. *Lancet*. 1999;353:1586–7.
79. Hogervorst E, Ribeiro HM, Molyneux A, Budge M, Smith AD. Plasma homocysteine levels, cerebrovascular risk factors, and cerebral white matter changes (leukoaraiosis) in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2002;59:787–93.
80. Joosten E, Lesaffre E, Riezler R, Ghekiere V, Dereymaeker L, Pelemans W, et al. Is metabolic evidence for vitamin B-12 and folate deficiency more frequent in elderly patients with Alzheimer's disease? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1997;52:M76–9.
81. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B₁₂, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1998;55:1449–55.
82. McCaddon A, Davies G, Hudson P, Tandy S, Cattell H. Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type. *Int J Geriatr Psychiatry*. 1998;13:235–9.
83. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2002;346:476–83.
84. Dufouil C, Alperovitch A, Ducros V, Tzourio C. Homocysteine, white matter hyperintensities, and cognition in healthy elderly people. *Ann Neurol*. 2003;53:214–21.
85. Bell IR, Edman JS, Selhub J, Morrow FD, Marby DW, Kayne HL, et al. Plasma homocysteine in vascular disease and in nonvascular dementia of depressed elderly people. *Acta Psychiatr Scand*. 1992;86:386–90.
86. Applebaum J, Shimon H, Sela BA, Belmaker RH, Levine J. Homocysteine levels in newly admitted schizophrenic patients. *J Psychiatr Res*. 2004;38:413–6.
87. Levine J, Stahl Z, Sela BA, Gavendo S, Ruderman V, Belmaker RH. Elevated homocysteine levels in young male patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2002;159:1790–2.
88. Troen AM. The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29:1140–51.
89. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:5923–8.
90. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*. 1994;330:613–22.
91. Robert K, Santiard-Baron D, Chasse JF, Paly E, Aupetit J, Kamoun P, et al. The neuronal SAPK/JNK pathway is altered in a murine model of hyperhomocysteinemia. *J Neurochem*. 2004;89:33–43.
92. Tyagi N, Gillespie W, Vacek JC, Sen U, Tyagi SC, Lominadze D. Activation of GABA-A receptor ameliorates homocysteine-induced

- MMP-9 activation by ERK pathway. *J Cell Physiol.* 2009;220:257–66.
93. Fuso A, Nicolai V, Cavallaro RA, Ricceri L, D'Anselmi F, Coluccia P, et al. B-vitamin deprivation induces hyperhomocysteinemia and brain S-adenosylhomocysteine, depletes brain S-adenosylmethionine, and enhances PS1 and BACE expression and amyloid-beta deposition in mice. *Mol Cell Neurosci.* 2008;37:731–46.
 94. Zou CG, Zhao YS, Gao SY, Li SD, Cao XZ, Zhang M, et al. Homocysteine promotes proliferation and activation of microglia. *Neurobiol Aging.* 2009.
 95. Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci.* 2000;20:6920–6.
 96. Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea TB. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: Glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res.* 2002;70:694–702.
 97. Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, et al. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2002;22:1752–62.
 98. Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2002;80:101–10.
 99. van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, Van der Klift M, De Jonge R, Lindemans J, et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med.* 2004;350:2033–41.
 100. Elshorbagy AK, Gjesdal CG, Nurk E, Tell GS, Ueland PM, Nygard O, et al. Cysteine, homocysteine and bone mineral density: A role for body composition? *Bone.* 2009;44:954–8.
 101. Levasseur R. Bone tissue and hyperhomocysteinemia. *Joint Bone Spine.* 2009;76:234–40.
 102. Lim U, Cassano PA. Homocysteine and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Am J Epidemiol.* 2002;156:1105–13.
 103. Ganapathy PS, Moister B, Roon P, Mysona BA, Duplantier J, Dun Y, et al. Endogenous elevation of homocysteine induces retinal neuron death in the cystathionine-beta-synthase mutant mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:4460–70.
 104. Fonseca VA, Fink LM, Kern PA. Insulin sensitivity and plasma homocysteine concentrations in non-diabetic obese and normal weight subjects. *Atherosclerosis.* 2003;167:105–9.
 105. Li Y, Jiang C, Xu G, Wang N, Zhu Y, Tang C, et al. Homocysteine upregulates resistin production from adipocytes in vivo and in vitro. *Diabetes.* 2008;57:817–27.
 106. Kozich V, Kraus E, de Franchis R, Fowler B, Boers GH, Graham I, et al. Hyperhomocysteinemia in premature arterial disease: Examination of cystathionine beta-synthase alleles at the molecular level. *Hum Mol Genet.* 1995;4:623–9.
 107. Kraus JP, Williamson CL, Firgaira FA, Yang-Feng TL, Munke M, Francke U, et al. Cloning and screening with nanogram amounts of immunopurified mRNAs: cDNA cloning and chromosomal mapping of cystathionine beta-synthase and the beta subunit of propionyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:2047–51.
 108. Mudd SH, Cerone R, Schiaffino MC, Fantasia AR, Minniti G, Caruso U, et al. Glycine N-methyltransferase deficiency: A novel inborn error causing persistent isolated hypermethioninaemia. *J Inher Metab Dis.* 2001;24:448–64.
 109. Skovby F, Gaustadnes M, Mudd SH. A revisit to the natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2010;99:1–3.
 110. Mudd SH, Levy HL. Plasma homocyst(e)ine or homocysteine? *N Engl J Med.* 1995;333:325.
 111. Mudd SH, Levy HL, Tangerman A, Boujet C, Buist N, Davidson-Mundt A, et al. Isolated persistent hypermethioninemia. *Am J Hum Genet.* 1995;57:882–92.
 112. Chu RC, Hall CA. The total serum homocysteine as an indicator of vitamin B12 and folate status. *Am J Clin Pathol.* 1988;90:446–9.
 113. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA.* 1993;270:2693–8.
 114. Selhub J, Bagley LC, Miller J, Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:614S–20S.
 115. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. Relationship between plasma homocysteine and vitamin status in the Framingham study population. Impact of folic acid fortification. *Public Health Rev.* 2000;28:117–45.
 116. Haynes WG. Hyperhomocysteinemia, vascular function and atherosclerosis: Effects of vitamins. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2002;16:391–9.
 117. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: Plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med.* 1989;114:473–501.
 118. Lakshmi AV, Maniprabha C, Krishna TP. Plasma homocysteine level in relation to folate and vitamin B6 status in apparently normal men. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2001;10:194–6.
 119. Refsum H, Ueland PM, Kivinsland S. Acute and long-term effects of high-dose methotrexate treatment on homocysteine in plasma and urine. *Cancer Res.* 1986;46:5385–91.
 120. Ermens AA, Refsum H, Ruprecht J, Spijkers LJ, Guttormsen AB, Lindemans J, et al. Monitoring cobalamin inactivation during nitrous oxide anesthesia by determination of homocysteine and folate in plasma and urine. *Clin Pharmacol Ther.* 1991;49:385–93.
 121. Ubbink JB, van der Merwe A, Delpont R, Allen RH, Stabler SP, Riezler R, et al. The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest.* 1996;98:177–84.
 122. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 1997;337:230–6.
 123. Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Stensvold I, Nordrehaug JE, Kvale G, et al. Coffee consumption and plasma total homocysteine: The Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr.* 1997;65:136–43.
 124. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Brattstrom L, Ueland PM. Total homocysteine and cardiovascular disease. *J Intern Med.* 1999;246:425–54.
 125. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, et al.; The Hordaland Homocysteine Study. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. *JAMA.* 1995;274:1526–33.
 126. Kluijtmans LA, Young IS, Boreham CA, Murray L, McMaster D, McNulty H, et al. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood.* 2003;101:2483–8.
 127. Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS. Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: An effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation.* 1999;99:1156–60.
 128. Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, Leopold JA, Rudd MA, Trollet M, et al. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest.* 2000;106:483–91.
 129. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: Role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 2003;108:933–8.

130. Lentz SR, Piegors DJ, Malinow MR, Heistad DD. Supplementation of atherogenic diet with B vitamins does not prevent atherosclerosis or vascular dysfunction in monkeys. *Circulation*. 2001;103:1006–11.
131. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, et al. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest*. 1993;91:308–18.
132. Looft-Wilson RC, Ashley BS, Billig JE, Wolfert MR, Ambrecht LA, Bearden SE. Chronic diet-induced hyperhomocysteinemia impairs eNOS regulation in mouse mesenteric arteries. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R59–66.
133. Faraci FM. Hyperhomocysteinemia: A million ways to lose control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:371–3.
134. Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1557–64.
135. Böger RH, Sullivan LM, Schwedhelm E, Wang TJ, Maas R, Benjamin EJ, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community. *Circulation*. 2009;119:1592–600.
136. Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci (Lond)*. 2001;100:161–7.
137. Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2001;88:1201–3.
138. Moshal KS, Tipparaju SM, Vacek TP, Kumar M, Singh M, Frank IE, et al. Mitochondrial matrix metalloproteinase activation decreases myocyte contractility in hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H890–7.
139. Moshal KS, Kumar M, Tyagi N, Mishra PK, Metreveli N, Rodriguez WE, et al. Restoration of contractility in hyperhomocysteinemia by cardiac-specific deletion of NMDA-R1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296:H887–92.
140. Moshal KS, Zeldin DC, Sithu SD, Sen U, Tyagi N, Kumar M, et al. Cytochrome P450 (CYP) 2J2 gene transfection attenuates MMP-9 via inhibition of NF-kappaB in hyperhomocysteinemia. *J Cell Physiol*. 2008;215:771–81.
141. Vacek TP, Sen U, Tyagi N, Vacek JC, Kumar M, Hughes WM, et al. Differential expression of Gs in a murine model of homocysteinemic heart failure. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5:79–84.
142. Kundu S, Kumar M, Sen U, Mishra PK, Tyagi N, Metreveli N, et al. Nitrotyrosinylation, remodeling and endothelial-myocyte uncoupling in iNOS, cystathionine beta synthase (CBS) knockouts and iNOS/CBS double knockout mice. *J Cell Biochem*. 2009;106:119–26.
143. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest*. 1986;77:1370–6.
144. Ungvari Z, Csiszar A, Bagi Z, Koller A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced coronary dilation in hyperhomocysteinemia: Morphological and functional evidence for increased peroxynitrite formation. *Am J Pathol*. 2002;161:145–53.
145. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest*. 1996;98:5–7.
146. Lang D, Kredan MB, Moat SJ, Hussain SA, Powell CA, Bellamy MF, et al. Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: Role for superoxide anions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:422–7.
147. Young PB, Kennedy S, Molloy AM, Scott JM, Weir DG, Kennedy DG. Lipid peroxidation induced in vivo by hyperhomocysteinemia in pigs. *Atherosclerosis*. 1997;129:67–71.
148. Soriano FG, Virag L, Szabo C. Diabetic endothelial dysfunction: Role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Mol Med*. 2001;79:437–48.
149. Xie JJ, Yu X, Liao YH, Chen J, Yao R, Chen Y, et al. Poly (ADP-Ribose) polymerase inhibition attenuates atherosclerotic plaque development in ApoE-/- mice with hyperhomocysteinemia. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16:641–53.
150. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: Implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001;103:1282–8.
151. Dayal S, Brown KL, Weydert CJ, Oberley LW, Arning E, Bottiglieri T, et al. Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes hyperhomocysteinemic mice to endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1996–2002.
152. Hirano K, Ogihara T, Miki M, Yasuda H, Tamai H, Kawamura N, et al. Homocysteine induces iron-catalyzed lipid peroxidation of low-density lipoprotein that is prevented by alpha-tocopherol. *Free Radic Res*. 1994;21:267–76.
153. Nakano E, Taiwo FA, Nugent D, Griffiths HR, Aldred S, Paisi M, et al. Downstream effects on human low density lipoprotein of homocysteine exported from endothelial cells in an in vitro system. *J Lipid Res*. 2005;46:484–93.
154. Wang G, Woo CW, Sung FL, Siow YL, OK. Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: Role of chemokine and adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1777–83.
155. Postea O, Koenen RR, Hristov M, Weber C, Ludwig A. Homocysteine up-regulates vascular transmembrane chemokine CXCL16 and induces CXCR6+ lymphocyte recruitment in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med*. 2008;12:1700–9.
156. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138:S419–20.
157. Ungvari Z, Csiszar A, Edwards JG, Kaminski PM, Wolin MS, Kaley G, et al. Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: Role of tumor necrosis factor-alpha, NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:418–24.
158. Zhang D, Jiang X, Fang P, Yan Y, Song J, Gupta S, et al. Hyperhomocysteinemia promotes inflammatory monocyte generation and accelerates atherosclerosis in transgenic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circulation*. 2009;120:1893–902.
159. Bea F, Hudson FN, Neff-Laford H, White CC, Kavanagh TJ, Kreuzer J, et al. Homocysteine stimulates antioxidant response element-mediated expression of glutamate-cysteine ligase in mouse macrophages. *Atherosclerosis*. 2009;203:105–11.
160. Dai J, Wang X, Feng J, Kong W, Xu Q, Shen X, et al. Regulatory role of thioredoxin in homocysteine-induced monocyte chemoattractant protein-1 secretion in monocytes/macrophages. *FEBS Lett*. 2008;582:3893–8.
161. Rodgers GM, Kane WH. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest*. 1986;77:1909–16.
162. Rodgers GM, Conn MT. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood*. 1990;75:895–901.
163. Hayashi T, Honda G, Suzuki K. An atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Blood*. 1992;79:2930–6.
164. Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest*. 1993;92:1381–6.

165. Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest.* 1993;91:2873–9.
166. Denis CV, Terraube V, Robert K, Janel N. Elevated plasma von Willebrand factor in a murine model of severe hyperhomocysteinemia. *Thromb Haemost.* 2003;90:362–4.
167. Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1327–33.
168. Sauls DL, Wolberg AS, Hoffman M. Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: Implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia. *J Thromb Haemost.* 2003;1:300–6.
169. Jacovina AT, Deora AB, Ling Q, Broekman MJ, Almeida D, Greenberg CB, et al. Homocysteine inhibits neoangiogenesis in mice through blockade of annexin A2-dependent fibrinolysis. *J Clin Invest.* 2009.
170. Castro R, Rivera I, Struys EA, Jansen EE, Ravasco P, Camilo ME, et al. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem.* 2003;49:1292–6.
171. Wang H, Yoshizumi M, Lai K, Tsai JC, Perrella MA, Haber E, et al. Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem.* 1997;272:25380–5.
172. Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood.* 1999;94:959–67.
173. Kokame K, Agarwala KL, Kato H, Miyata T. Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2000;275:32846–53.
174. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest.* 2001;107:1263–73.
175. Henkel AS, Elias MS, Green RM. Homocysteine supplementation attenuates the unfolded protein response in a murine nutritional model of steatohepatitis. *J Biol Chem.* 2009.
176. Jakubowski H. Translational incorporation of S-nitrosohomocysteine into protein. *J Biol Chem.* 2000;275:21813–6.
177. Jakubowski H, Zhang L, Bardeguet A, Aviv A. Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: Implications for atherosclerosis. *Circ Res.* 2000;87:45–51.
178. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59:155–67.
179. Jakubowski H, Perla-Kaján J, Finnell RH, Cabrera RM, Wang H, Gupta S, et al. Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice. *FASEB J.* 2009;23:1721–7.
180. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, et al. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: A link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:6369–73.
181. Tsai JC, Wang H, Perrella MA, Yoshizumi M, Sibinga NE, Tan LC, et al. Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1996;97:146–53.
182. Lee SJ, Kim KM, Namkoong S, Kim CK, Kang YC, Lee H, et al. Nitric oxide inhibition of homocysteine-induced human endothelial cell apoptosis by down-regulation of p53-dependent Noxa expression through the formation of S-nitrosohomocysteine. *J Biol Chem.* 2005;280:5781–8.
183. Wang L, Jhee KH, Hua X, DiBello PM, Jacobsen DW, Kruger WD. Modulation of cystathionine beta-synthase level regulates total serum homocysteine in mice. *Circ Res.* 2004;94:1318–24.
184. Woo CW, Siow YL, Pierce GN, Choy PC, Minuk GY, Mymin D, et al. Hyperhomocysteinemia induces hepatic cholesterol biosynthesis and lipid accumulation via activation of transcription factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288:E1002–10.
185. Song Y, Cho M, Cho C, Rosenfeld ME. Methionine-induced hyperhomocysteinemia modulates lipoprotein profile and oxidative stress but not progression of atherosclerosis in aged apolipoprotein E knockout mice. *J Med Food.* 2009;12:137–44.
186. Zhou J, Werstuck GH, Lhotak S, Shi YY, Tedesco V, Trigatti B, et al. Hyperhomocysteinemia induced by methionine supplementation does not independently cause atherosclerosis in C57BL/6J mice. *FASEB J.* 2008;22:2569–78.
187. Vélez-Carrasco W, Merkel M, Twiss CO, Smith JD. Dietary methionine effects on plasma homocysteine and HDL metabolism in mice. *J Nutr Biochem.* 2008;19:362–70.
188. Schwahn BC, Wendel U, Lussier-Cacan S, Mar MH, Zeisel SH, Leclerc D, et al. Effects of betaine in a murine model of mild cystathionine-beta-synthase deficiency. *Metabolism.* 2004;53:594–9.
189. Chen C, Surowiec SM, Morsy AH, Ma M. Intraperitoneal infusion of homocysteine increases intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries. *Atherosclerosis.* 2002;160:103–14.
190. Swanson DA, Liu ML, Baker PJ, Garrett L, Stitzel M, Wu J, et al. Targeted disruption of the methionine synthase gene in mice. *Mol Cell Biol.* 2001;21:1058–65.
191. Elmore CL, Wu X, Leclerc D, Watson ED, Bottiglieri T, Krupenko NI, et al. Metabolic derangement of methionine and folate metabolism in mice deficient in methionine synthase reductase. *Mol Genet Metab.* 2007;91:85–97.
192. Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet.* 2001;10:433–43.
193. Schwahn BC, Chen Z, Laryea MD, Wendel U, Lussier-Cacan S, Genest Jr J, et al. Homocysteine-betaine interactions in a murine model of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *FASEB J.* 2003;17:512–4.
194. Chen Z, Schwahn BC, Wu Q, He X, Rozen R. Postnatal cerebellar defects in mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase. *Int J Dev Neurosci.* 2005;23:465–74.
195. Kelly TL, Neaga OR, Schwahn BC, Rozen R, Trasler JM. Infertility in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-deficient male mice is partially alleviated by lifetime dietary betaine supplementation. *Biol Reprod.* 2005;72:667–77.
196. Schwahn BC, Wang XL, Mikael LG, Wu Q, Cohn J, Jiang H, et al. Betaine supplementation improves the atherogenic risk factor profile in a transgenic mouse model of hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis.* 2007;195:e100–7.
197. Tabrizchi R, Bedi S. Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature. *Pharmacol Ther.* 2001;91:133–47.
198. Cristalli G, Volpini R, Vittori S, Camaioni E, Monopoli A, Conti A, et al. 2-Alkynyl derivatives of adenosine-5'-N-ethyluronamide: Selective A2 adenosine receptor agonists with potent inhibitory activity on platelet aggregation. *J Med Chem.* 1994;37:1720–6.
199. Riksen NP, Rongen GA, Blom HJ, Russel FG, Boers GH, Smits P. Potential role for adenosine in the pathogenesis of the vascular complications of hyperhomocysteinemia. *Cardiovasc Res.* 2003;59:271–6.
200. Virdis A, Iglarz M, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Rozen R, et al. Effect of hyperhomocysteinemia and hypertension on endothelial function in methylenetetrahydrofolate reductase-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1352–7.

201. Robert K, Maurin N, Vayssettes C, Siauve N, Janel N. Cystathionine beta synthase deficiency affects mouse endochondral ossification. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2005;282:1–7.
202. Akahoshi N, Kobayashi C, Ishizaki Y, Izumi T, Himi T, Suematsu M, et al. Genetic background conversion ameliorates semi-lethality and permits behavioral analyses in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia. *Hum Mol Genet*. 2008;17:1994–2005.
203. Noll C, Hamelet J, Matulewicz E, Paul JL, Delabar JM, Janel N. Effects of red wine polyphenolic compounds on paraoxonase-1 and lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in hyperhomocysteinemic mice. *J Nutr Biochem*. 2009;20:586–96.
204. Choumenkovitch SF, Selhub J, Bagley PJ, Maeda N, Nadeau MR, Smith DE, et al. In the cystathionine beta-synthase knockout mouse, elevations in total plasma homocysteine increase tissue S-adenosylhomocysteine, but responses of S-adenosylmethionine and DNA methylation are tissue specific. *J Nutr*. 2002;132:2157–60.
205. Robert K, Vialard F, Thiery E, Toyama K, Sinet PM, Janel N, et al. Expression of the cystathionine beta synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain. *J Histochem Cytochem*. 2003;51:363–71.
206. Robert K, Nehme J, Bourdon E, Pivert G, Friguet B, Delcayre C, et al. Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. *Gastroenterology*. 2005;128:1405–15.
207. Hamelet J, Seltzer V, Petit E, Noll C, Andreau K, Delabar JM, et al. Cystathionine beta synthase deficiency induces catalase-mediated hydrogen peroxide detoxification in mice liver. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1782:482–8.
208. Hamelet J, Couty JP, Crain AM, Noll C, Postic C, Paul JL, et al. Calpain activation is required for homocysteine-mediated hepatic degradation of inhibitor I kappa B alpha. *Mol Genet Metab*. 2009;97:114–20.
209. Vitvitsky V, Dayal S, Stabler S, Zhou Y, Wang H, Lentz SR, et al. Perturbations in homocysteine-linked redox homeostasis in a murine model for hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287:R39–46.
210. Noga AA, Vance DE. A gender-specific role for phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-derived phosphatidylcholine in the regulation of plasma high density and very low density lipoproteins in mice. *J Biol Chem*. 2003;278:21851–9.
211. Namekata K, Enokido Y, Ishii I, Nagai Y, Harada T, Kimura H. Abnormal lipid metabolism in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem*. 2004;279:52961–9.
212. Noll C, Planque C, Ripoll C, Guedj F, Diez A, Ducros V, et al. DYRK1A, a novel determinant of the methionine-homocysteine cycle in different mouse models overexpressing this Down-syndrome-associated kinase. *PLoS One*. 2009;4:e7540.
213. Hamelet J, Noll C, Ripoll C, Paul JL, Janel N, Delabar JM. Effect of hyperhomocysteinemia on the protein kinase DYRK1A in liver of mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378:673–7.
214. Li S, Arning E, Liu C, Vitvitsky V, Hernández C, Banerjee R, et al. Regulation of homocysteine homeostasis through the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296:E543–8.
215. Wang H, Jiang X, Yang F, Gaubatz JW, Ma L, Magera MJ, et al. Hyperhomocysteinemia accelerates atherosclerosis in cystathionine beta-synthase and apolipoprotein E double knock-out mice with and without dietary perturbation. *Blood*. 2003;101:3901–7.
216. Ikeyama S, Wang XT, Li J, Podlitsky A, Martindale JL, Kokkonen G, et al. Expression of the pro-apoptotic gene gadd153/chop is elevated in liver with aging and sensitizes cells to oxidant injury. *J Biol Chem*. 2003;278:16726–31.
217. Mikael LG, Wang XL, Wu Q, Jiang H, Maclean KN, Rozen R. Hyperhomocysteinemia is associated with hypertriglyceridemia in mice with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2009;98:187–94.
218. Wang L, Chen X, Tang B, Hua X, Klein-Szanto A, Kruger WD. Expression of mutant human cystathionine beta-synthase rescues neonatal lethality but not homocystinuria in a mouse model. *Hum Mol Genet*. 2005;14:2201–8.
219. Gupta S, Kuhnisch J, Mustafa A, Lhotak S, Schlachterman A, Slifker MJ, et al. Mouse models of cystathionine beta-synthase deficiency reveal significant threshold effects of hyperhomocysteinemia. *FASEB J*. 2009;23:883–93.
220. Gupta S, Wang L, Hua X, Krijt J, Kozich V, Kruger WD. Cystathionine beta-synthase p.S466L mutation causes hyperhomocysteinemia in mice. *Hum Mutat*. 2008;29:1048–54.
221. Carnicer R, Navarro MA, Arbonés-Mainar JM, Arnal C, Surra JC, Acín S, et al. Genetically based hypertension generated through interaction of mild hypoalphalipoproteinemia and mild hyperhomocysteinemia. *J Hypertens*. 2007;25:1597–607.
222. Carnicer R, Guzmán MA, Acín S, Surra JC, Navarro MA, Arbonés-Mainar JM, et al. Genetic background in apolipoprotein A-I and cystathionine beta-synthase deficiency. *Front Biosci*. 2008;13:5155–62.
223. Carnicer R, Navarro MA, Guillén N, Arbonés-Mainar JM, Surra JC, Acín S, et al. Simvastatin reverses the hypertension of heterozygous mice lacking cystathionine beta-synthase and apolipoprotein A-I. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2008;377:35–43.
224. Dayal S, Lentz SR. Murine models of hyperhomocysteinemia and their vascular phenotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1596–605.
225. Park CM, Cho CW, Rosenfeld ME, Song YS. Methionine supplementation accelerates oxidative stress and nuclear factor kappaB activation in livers of C57BL/6 mice. *J Med Food*. 2008;11:667–74.
226. Troen AM, Shea-Budgell M, Shukitt-Hale B, Smith DE, Selhub J, Rosenberg IH. B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:12474–9.
227. Lentz SR, Piegors DJ, Fernández JA, Erger RA, Arning E, Malinow MR, et al. Effect of hyperhomocysteinemia on protein C activation and activity. *Blood*. 2002;100:2108–12.
228. Dayal S, Rodionov RN, Arning E, Bottiglieri T, Kimoto M, Murry DJ, et al. Tissue-specific downregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase in hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H816–25.
229. Schwahn BC, Laryea MD, Chen Z, Melnyk S, Pogribny I, Garrow T, et al. Betaine rescue of an animal model with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Biochem J*. 2004;382:831–40.
230. Da Costa KA, Gaffney CE, Fischer LM, Zeisel SH. Choline deficiency in mice and humans is associated with increased plasma homocysteine concentration after a methionine load. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:440–4.
231. Claes L, Schmalenbach J, Herrmann M, Olkü I, Garcia P, Histing T, et al. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int*. 2009;85:17–21.
232. Zhou J, Moller J, Ritskes-Hoitinga M, Larsen ML, Austin RC, Falk E. Effects of vitamin supplementation and hyperhomocysteinemia on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2003;168:255–62.
233. Thampi P, Stewart BW, Joseph L, Melnyk SB, Hennings LJ, Nagarajan S. Dietary homocysteine promotes atherosclerosis in apoE-deficient mice by inducing scavenger receptors expression. *Atherosclerosis*. 2008;197:620–9.
234. Perla-Kajan J, Stanger O, Luczak M, Ziolkowska A, Malendowicz LK, Twardowski T, et al. Immunohistochemical detection of N-homocysteinylated proteins in humans and mice. *Biomed Pharmacother*. 2008;62:473–9.

235. Wilson KM, McCaw RB, Leo L, Arning E, Lhotak S, Bottiglieri T, et al. Prothrombotic effects of hyperhomocysteinemia and hypercholesterolemia in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:233–40.
236. Noll C, Hamelet J, Ducros V, Belin N, Paul JL, Delabar JM, et al. Resveratrol supplementation worsen the dysregulation of genes involved in hepatic lipid homeostasis observed in hyperhomocysteinemic mice. *Food Chem Toxicol.* 2009;47:230–6.