

Homocisteína y Polimorfismos de los Genes MTHFR y VEGF: Impacto en la Enfermedad Arterial Coronaria

Alexandre Rodrigues Guerzoni¹, Patrícia Matos Biselli¹, Moacir Fernandes de Godoy¹, Doroteia Rossi Silva Souza¹, Renato Haddad², Marcos Nogueira Eberlin², Erika Cristina Pavarino-Bertelli¹, Eny Maria Goloni-Bertollo¹

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP¹, São José do Rio Preto, SP; Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP², Campinas, SP - Brasil

Resumen

Fundamento: Polimorfismos en genes relacionados al desarrollo de la aterosclerosis, la angiogénesis y el metabolismo de la homocisteína (Hcy) pueden ser factores de riesgo para la enfermedad arterial coronaria (EAC).

Objetivo: Evaluar el efecto de los polimorfismos VEGF C-2578A y MTHFR C677T en la EAC y la asociación de esos polimorfismos con la severidad y la extensión de las lesiones ateroscleróticas y concentraciones de Hcy.

Métodos: Se evaluaron a 244 individuos por medio de angiografía coronaria y se les incluyeron en el estudio (145 con EAC y 99 individuos-control). Los polimorfismos VEGF C-2578A y MTHFR C677T se investigaron mediante las técnicas de PCR-SSCP y PCR-RFLP, respectivamente. Se midieron los niveles de homocisteína plasmática por medio de cromatografía líquida/espectrometría de masa secuencial (CL/EMS).

Resultados: No hubo diferencia significativa en relación con la distribución de alelos y genotipos entre los grupos, para ambos polimorfismos. El análisis univariado reveló una frecuencia mayor del genotipo VEGF-2578AA en el grupo con enfermedad en tres vasos ($P=0,044$). Además de ello, se observó el genotipo VEGF-2578CA con más frecuencia entre individuos con $<95\%$ de estenosis ($p=0,010$). Tras ajuste para otros factores de riesgo para EAC en un modelo multivariado, se evidenció que el polimorfismo VEGF C-2578A no era un correlato independiente de la EAC ($p=0,688$). El polimorfismo MTHFR no mostró cualquier relación con la extensión y/o severidad de la EAC. El polimorfismo MTHFR C677T no evidenció una asociación directa con hiperhomocisteinemia o aumento de las concentraciones promedio de Hcy en el plasma.

Conclusión: Si bien existe una aparente asociación entre el polimorfismo VEGF C-2578A y el desarrollo de aterosclerosis coronaria, esa asociación no es independiente de los factores de riesgo cardiovasculares convencionales. (Arq Bras Cardiol 2009;92(4):256-261)

Palabras clave: Enfermedad de arteria coronaria, aterosclerosis, polimorfismo genético, homocisteína.

Introducción

El gen que codifica el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ha sido estudiado en el desarrollo de enfermedades coronarias¹⁻³. El VEGF, presente en las paredes de los vasos, promueve la proliferación de las células endoteliales vasculares y la angiogénesis, pero su rol en la aterosclerosis todavía está poco aclarado. Hay estudios que señalan que el VEGF es un factor de protección en el desarrollo de la placa aterosclerótica, al operar como un regulador de la integridad endotelial de la pared arterial coronaria^{4,5}. Por otra parte, hay otros que evidencian la neovascularización, mediada por el VEGF, como el factor que influye en la patogénesis de las enfermedades arteriales⁶.

Alteraciones de las concentraciones de VEGF pueden ser

mediadas por polimorfismos genéticos^{7,8}. Se describieron en el gen VEGF diversos polimorfismos de nucleótido único (SNPs). Renner et al.⁷ describieron tres polimorfismos del gen VEGF (C702T, C936T y G1612A), además de haber observado niveles significativamente más bajos de VEGF en el plasma en portadores del alelo 936T, cuando comparados con no-portadores. Los polimorfismos C702T y G1612 no evidenciaron asociación con los niveles de VEGF. También se asociaron niveles elevados con el alelo G en el nucleótido VEGF -1154⁸. En un estudio con pacientes sometidos a angiografía coronaria, se consideró el polimorfismo C-2578A como un factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis¹. Ya se ha asociado esa variación genética con una menor expresión del VEGF⁸.

La hiperhomocisteinemia, es decir, el aumento de la concentración de homocisteína (Hcy) en la sangre, se la considera como un factor de riesgo independiente para la aterosclerosis y la enfermedad arterial coronaria (EAC)⁹. El aumento de las concentraciones de Hcy es encontrado en el 40% de los pacientes con una enfermedad arterial coronaria, arterial cerebral o arterial periférica y en solamente el 15% de individuos sanos¹⁰.

Correspondencia: Patrícia Matos Biselli •

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, São Pedro, 15.090-000, São José do Rio Preto, SP - Brasil

E-mail: patriciabiselli@famerp.br

Artículo recibido el 15/06/07; revisado recibido el 17/10/07; aceptado el 27/01/08.

El mecanismo mediante el cual la hiperhomocisteinemia induce el desarrollo de lesiones vasculares es todavía poco conocido. Evidencias experimentales sugieren que la Hcy puede estar involucrada en la aterogénesis y la trombogénesis, conllevando a la hiperplasia de la célula muscular y la fibrosis^{10,11}. Concentraciones anormales de Hcy pueden resultar de la interacción de factores genéticos y nutricionales¹². La enzima metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), que desempeña un rol importante en el metabolismo de la Hcy, presenta la reducción de la actividad como resultado del polimorfismo en la posición 677 del gen MTHFR y conlleva al aumento de las concentraciones de Hcy¹³. La variante alélica MTHFR 677T ha sido encontrada con alta frecuencia en pacientes con enfermedades vasculares¹⁴⁻¹⁷.

En el presente estudio, analizamos la frecuencia de los polimorfismos VEGF C-2578A y MTHFR C677T en pacientes con EAC y en un grupo de individuos sin señales angiográficas de la enfermedad. Evaluamos también la asociación entre esos polimorfismos y la severidad y extensión de las lesiones ateroscleróticas y las concentraciones plasmáticas de Hcy.

Métodos

Sujetos del estudio

El presente estudio fue aprobado por la Comisión Nacional de Ética en Investigación – CONEP, DF, Brasil. Tras la obtención del Consentimiento Informado, se incluyeron en el estudio a 244 individuos caucasoides (145 con EAC y 99 sin la enfermedad). Se eliminó o se confirmó el diagnóstico de EAC mediante angiografía coronaria, analizada por dos observadores independientes en un análisis ciego cuantitativo, llevada a cabo en el Laboratorio de Cateterismo. Se excluyeron del estudio tanto a los individuos que habían sido sometidos a cirugía cardíaca como aquellos con prótesis coronaria. Aunque el mestizaje en el Brasil es ampliamente común, consideramos como caucasoides aquellos individuos que no presentaban otros grupos étnicos en las tres generaciones precedentes¹⁸.

Se determinó la extensión de la EAC de acuerdo con el número de vasos coronarios involucrados (0 a 3) y la severidad con base en el grado de obstrucción arterial (estenosis <50%, >50-75%, >75-95%, y >95%). Se consideró la fracción de eyección (FE) < 40% como daño ventricular. Se consideró la angina típica como presente o ausente. Los factores de riesgo clásicos para EAC también se investigaron. Los criterios para la definición de diabetes fueron el uso de agentes hipoglucemiantes orales o tratamiento con insulina, o niveles glucémicos > 126 mg/dL; para hipertensión, el uso de fármaco antihipertensivo o presión arterial > 140/90 mmHg; para sedentarismo, la ausencia de ejercicios regulares y controlados; para alcoholismo, la ingestión de alcohol con una frecuencia definida sin un análisis cuantitativo; a individuos que habían fumado ≥ 100 cigarrillos durante su vida y en el momento fumaban todos los días o en algunos días, se les consideraron como fumadores.

Análisis bioquímico

Se colectaron muestras de sangre periférica de los pacientes, durante el examen angiográfico, tras ayuno de 12

horas. Se hizo la separación del plasma en hasta una hora tras la colecta de la sangre para la medición de la Hcy, de acuerdo con el método de cromatografía líquida/espectrometría de masa secuencial (CL/EMS)¹⁹. Las concentraciones de Hcy >15 $\mu\text{mol/mL}$ se las consideraron como caracterizadoras de hiperhomocisteinemia²⁰. Los procedimientos para determinación del perfil lipídico tuvieron lugar en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de Base de la Facultad de Medicina de São José do Rio Preto.

Se midieron los triglicéridos (TG), el colesterol total (CT), las lipoproteínas de alta densidad (HDL_c) y las lipoproteínas de baja densidad (LDL_c) con el método colorimétrico enzimático.

Determinación de genotipo

Se extrajo el DNA genómico de leucocitos de sangre periférica²¹. Se investigó el polimorfismo VEGF C-2578A con el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa – Polimorfismo de Conformación Monocatenaria (PCR-SSCP), de acuerdo con Brogan et al.²². Se realizaron 30 ciclos de amplificación (95°C por 30s, 62°C por 30s, y 72°C por 60s) para amplificar un producto de 309 pb. Así, 6 μL del producto de la PCR se desnaturalizaron a 95°C por 5 minutos, con 6 μL de solución colorante para electroforesis (80% v/v formamida; 10mM NaOH; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1% w/v de azul de bromofenol y el 1,1% xilenocianol). Se analizaron los productos desnaturalizados por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida y tras tinción con nitrato de plata se los visualizaron.

La genotipificación para el polimorfismo MTHFR C677T se llevó a cabo por medio de PCR, seguida por digestión enzimática¹⁶. Se ejecutaron 35 ciclos (94°C por 60s, 58°C por 60s, y 72°C por 60s) para amplificar un producto de 198 pb. Se digirieron los productos de PCR con la enzima de restricción Hinf I y se analizaron los fragmentos en gel de poliacrilamida a un 9,6%, tras tinción con nitrato de plata. No se digirió el alelo C, mientras que se dividió el alelo T en dos fragmentos de 175 y 23 pb, respectivamente.

Análisis estadístico

Se presentan los datos como promedios \pm desviaciones estándar (DE) o números (porcentajes). La comparación entre los grupos se realizó con la utilización de la prueba de Chi-cuadrado, el test *t* de Student o la prueba de Mann-Whitney, cuando necesario. Se utilizó el análisis de dependencia para examinar las diferencias de las frecuencias de genotipo entre los grupos con una, dos o tres arterias afectadas, y entre grupos con diferentes grados de estenosis. Se diseñaron los valores de Hcy con base en una distribución normal en la escala logarítmica. La concentración de Hcy ante el polimorfismo MTHFR se la evaluó mediante el análisis de varianza (ANOVA). Se probó por medio de análisis de regresión logística múltiple la relación independiente de los polimorfismos VEGF C-2578A y MTHFR C677T con los factores de riesgo en la presencia de EAC. Un valor de $p \leq 0,05$ se utilizó para establecer la significancia estadística.

Resultados

Las características de la población estudiada están detalladas en la Tabla 1. Los resultados significativamente diferentes obtenidos para individuos con y sin EAC están de acuerdo con los factores de riesgo cardiovascular previamente establecidos.

Polimorfismo del gen del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

No hubo diferencia significativa entre los grupos respecto a las frecuencias de alelos ($p=0,995$) y genotipo ($p=0,254$) del polimorfismo VEGF C-2578A. Los cálculos para la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) revelaron que la distribución genotípica observada se mostró similar a la que se esperaba, en el grupo con EAC y en el grupo control ($\chi^2_1 = 3,12$; $p=0,077$ y $\chi^2_1 = 0,46$; $p=0,496$, respectivamente).

Las frecuencias genotípicas de acuerdo con el número de vasos involucrados y el grado de obstrucción arterial están detalladas en las Tablas 2 y 3, respectivamente. Una frecuencia significativamente más alta del genotipo VEGF -2578AA se observó en individuos con tres arterias afectadas ($p=0,044$). Respecto al grado de obstrucción arterial, el genotipo VEGF -2578CA se observó con más frecuencia en individuos con < 95% de estenosis ($p=0,010$).

Polimorfismo del gen de la metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y concentraciones de homocisteína

No hubo diferencia significativa entre los grupos respecto a las frecuencias de alelos ($p=0,895$) y genotipo ($p=0,884$) del polimorfismo MTHFR C677T. La distribución genotípica

observada fue semejante a la que se esperaba en el grupo control ($\chi^2_1 = 2,23$; $p=0,135$). Sin embargo, en el grupo con EAC, presentó desequilibrio de Hardy-Weinberg, con una diferencia significativa entre las frecuencias observada y esperada ($\chi^2_1 = 5,76$; $p=0,016$).

Ninguna asociación se observó entre el polimorfismo MTHFR C677T y el número de vasos involucrados y/o el grado de obstrucción arterial (Tablas 2 y 3). La concentración promedio de Hcy no difirió significativamente entre los grupos ($p= 0,222$), así como la presencia de hiperhomocisteinemia ($p=0,266$). El promedio de la concentración de Hcy no presentó ninguna asociación con el número de vasos involucrados ($p= 0,793$) o el grado de obstrucción arterial ($p= 0,700$).

El polimorfismo MTHFR C677T no evidenció una relación directa con la hiperhomocisteinemia ($p=0,860$) o aumento de la concentración promedio de Hcy ($p=0,758$).

Análisis multivariado

La regresión logística múltiple se utilizó para probar los correlatos independientes para la presencia de EAC. El modelo incluyó: tabaquismo, hipertensión, diabetes, niveles de HDL_c y los polimorfismos VEGF C-2578A y MTHFR C677T. Tabaquismo ($p=0,006$), diabetes ($p=0,041$), y niveles de HDL_c <40 mg/dL ($p=0,0008$) se correlacionaron independientemente de la presencia de EAC. La hipertensión evidenció una tendencia a la asociación con EAC ($p=0,061$).

Tabla 1 - Características de la población estudiada

	EAC (n = 145)	Controles (n = 99)	Valor de p
Edade (años)	60,4±12,3	57,8±11,4	0,084
Sexo			0,066
Masculino	93(64)	51(52)	
Femenino	52(36)	48(48)	
Hipertensión	113(78)	66(67)	0,708
Diabetes	36(25)	13(13)	0,040
Sedentarismo	63(43)	50(51)	0,339
Fumador	100(69)	52(53)	0,014
Angina	115(79)	68(69)	0,083
Daño ventricular	50(34)	14(14)	0,0007
Alcoholismo	48(33)	25(25)	0,240
Colesterol Total (>200mg/dl)	60(41)	41(41)	0,996
HDL _c (<40 mg/dl)	78(54)	31(31)	0,0008
LDL _c (>130 mg/dl)	57(40)	36(36)	0,740
VLDL _c (> 30 mg/dl)	58(40)	33(33)	0,356
Triglicéridos (>150 mg/dl)	63(43)	36(36)	0,330

Valores están expresados como promedio + DE o número (%); EAC - enfermedad arterial coronaria; HDL_c - lipoproteína de alta densidad; LDL_c - lipoproteína de baja densidad; VLDL_c - lipoproteína de muy baja densidad.

Tabla 2 - Frecuencias de los genotipos en pacientes con una, dos, y tres arterias afectadas

Polimorfismo		Una arteria afectada	Dos arterias afectadas	Tres arterias afectadas	Valor de p
		N (%)	N (%)	N (%)	
VEGF -2578	CC	15 (44)	14 (41)	5 (15)	0,044
	CA	32 (38)	28 (34)	23 (28)	
	AA	6 (21)	8 (29)	14 (50)	
MTHFR 677	CC	24 (45)	16 (30)	13 (25)	0,548
	CT	25 (31)	29 (36)	26 (33)	
	TT	4 (33)	5 (42)	3 (25)	

Tabela 3 - Frecuencias de los genotipos en pacientes con <50%, >50-75%, >75-95%, y >95% de estenosis

Polimorfismo		Grado de estenosis				Valor de p
		<50%	>50-75%	>75-95%	>95%	
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
VEGF -2578	CC	2 (6)	6 (18)	16 (47)	10 (29)	0,010
	CA	9 (11)	17 (21)	45 (54)	12 (14)	
	AA	0 (0)	4 (14)	13 (47)	11 (39)	
MTHFR 677	CC	4 (7)	10 (19)	27 (51)	12 (23)	0,991
	CT	6 (8)	16 (20)	41 (51)	17 (21)	
	TT	1 (8)	1 (8)	6 (50)	4 (34)	

Los polimorfismos VEGF C-2578A ($p=0,688$) y MTHFR C677T ($p=0,981$) no fueron predictores independientes de EAC.

Discusión

En el presente estudio, la frecuencia alélica y la genotípica del polimorfismo VEGF C-2578A no difirieron entre pacientes con y sin EAC. Sin embargo, se observó una mayor frecuencia del genotipo VEGF-2578AA en individuos con tres arterias afectadas. Este resultado corrobora los hallazgos de un estudio reciente de Howell et al.¹ que consideró el genotipo VEGF-2578AA como un factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis, mientras que el genotipo VEGF -2578CC evidenció tener un efecto protector. De acuerdo con ese estudio, la frecuencia del genotipo VEGF -2578AA aumentó gradualmente con el número de vasos involucrados, cuando comparada con el genotipo salvaje (*wild-type*) VEGF -2578CC. Eso sugiere que la reducción de la expresión del VEGF resultante del genotipo VEGF-2578AA podría promover el desarrollo de aterosclerosis. La mayor frecuencia del genotipo VEGF-2578CA entre individuos con < 95% de estenosis sugiere una asociación entre ese genotipo y la progresión más lenta de la lesión aterosclerótica, posiblemente a causa de la presencia del alelo salvaje. No obstante, no se encontró ninguna asociación con relación al genotipo salvaje VEGF-2578CC, posiblemente en función del número reducido de individuos en la muestra.

Si bien nuestros resultados en relación con el polimorfismo del VEGF y la severidad y extensión de la EAC son significantes, tras el ajuste para otros factores de riesgo en un modelo multivariado, la asociación positiva entre el polimorfismo VEGF C-2578A y la severidad de la EAC perdió significancia estadística. Ya que el polimorfismo VEGF C-2578A no fue un factor de riesgo independiente para la EAC, esos datos no confirman la relación casual entre el polimorfismo VEGF C-2578A y la aterosclerosis coronaria.

El rol del VEGF en la aterosclerosis es motivo de discusión en la literatura. Algunos estudios evidenciaron que la administración de VEGF humano recombinante en animales aumenta la progresión de la placa aterosclerótica²³. Otros observaron que el VEGF humano opera como un factor anti-aterosclerótico, y promueve la reendotelización, reduciendo el espesor de la capa íntima, lo que previene la formación de coágulos⁵.

No analizamos en el presente estudio las correlaciones entre genotipos y expresión. Sin embargo, un estudio realizado por Shahbazi et al.⁸ con receptores de transplante renal, reveló una asociación entre el alelo salvaje VEGF 2578C y el aumento de las concentraciones de VEGF. Otros polimorfismos del gen VEGF ya se asociaron a variaciones en la expresión de la proteína^{7,8}. Según Howell et al.¹, el genotipo VEGF -2578AA se podría considerar como un factor de riesgo para aterosclerosis, en función de la reducción de la expresión de la proteína. Ese resultado es consistente con la acción de VEGF en la regulación endógena de la integridad endotelial de la pared de la arteria coronaria⁴. Por otra parte, la neovascularización de la placa aterosclerótica, mediada por el VEGF, dispone nutrientes y componentes de la placa, aumentando su volumen. En paredes arteriales con oclusión total por placas

ateroscleróticas, como observado en estudio prospectivo, se correlacionaron –en su anatomía y cantidad–, los microvasos denominados *vasa vasorum*, al grado de inflamación de la placa intimal²⁴. Moulton et al.²⁵ observaron una reducción en la progresión de la aterosclerosis secundaria a la inhibición de la neovascularización mediada por el VEGF. De ese modo, se necesitan más estudios para aclarar el verdadero rol del VEGF en la EAC.

En ese estudio, las frecuencias alélica y genotípica del polimorfismo MTHFR C677T no fueron diferentes entre pacientes y controles. Sin embargo, en el grupo con EAC, la distribución genotípica observada fue diferente de la que se esperaba de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW). Estudios de caso-control con análisis de SNPs mostraron fuga del EHW en pacientes, en controles o en ambos grupos²⁶⁻²⁸. Se puede esperar ese desequilibrio para diversas enfermedades genéticas, considerando que haya probablemente un aporte genético significativo en enfermedades complejas²⁹. Aunque algunos estudios han encontrado evidencia de asociación entre el alelo polimórfico MTHFR 677T y enfermedades vasculares, aterosclerosis carotídea, enfermedad arterial oclusiva e infarto de miocardio^{15-17,30-32}, otros no confirmaron esas hipótesis^{11,33}.

Alrededor del 40% de los pacientes con EAC presentaban hiperhomocisteinemia³⁴. En nuestro estudio, un 49,7% de los pacientes con EAC y un 45,2% de los controles presentaban concentraciones de Hcy >15 $\mu\text{mol/l}$, y esa diferencia no fue significativa. Otro estudio brasileño evidenció una diferencia significativa en concentraciones de Hcy entre el grupo control y el grupo con ateromatosis severa. Esos autores también observaron una correlación positiva entre niveles más altos de Hcy y EAC³⁵. En nuestro estudio, encontramos concentraciones promedio más altas de Hcy en el grupo con EAC cuando comparados al grupo control, pero la diferencia no fue significativa (datos no revelados), lo que está de acuerdo con los hallazgos de Yilmaz et al.³⁶.

Estudios clínicos involucrando tratamientos para reducir los niveles de homocisteína han demostrado que la suplementación con folato no redujo el riesgo de complicaciones y muerte por causas cardiovasculares, a pesar de una reducción substancial en los niveles plasmáticos totales de Hcy^{37,38}. Aunque estudios observacionales han demostrado que el nivel plasmático total de Hcy es un predictor de eventos cardiovasculares³⁹, ningún rol causativo de la Hcy fue substanciado por los resultados de estudios de intervención implicando tratamiento para reducción de niveles de homocisteína.

En el estudio prospectivo de Frederiksen et al.⁴⁰, la concentración promedio de Hcy era más elevada en portadores del genotipo MTHFR 677TT cuando comparados a otros genotipos. Sin embargo, el polimorfismo MTHFR C677T no fue asociado con enfermedad isquémica cardiovascular o tromboembolismo. Huh et al.⁴¹ y Yilmaz et al.³⁶ relataron observaciones semejantes en estudios de EAC. En las poblaciones estudiadas en el presente estudio, el polimorfismo MTHFR C677T no presentó una relación directa con la hiperhomocisteinemia o aumento de las concentraciones promedio de Hcy, en los grupos con EAC o control. Lima et al.³⁵ también observaron una correlación entre la presencia de esa mutación y la hiperhomocisteinemia, en un estudio brasileño.

El tamaño de la muestra es un factor importante en estudios de caso-control, principalmente en investigaciones de polimorfismos genéticos con alta frecuencia en la población en general. Aunque el número de individuos evaluados en ese estudio es suficiente para demostrar una diferencia estadística en la distribución del genotipo entre los subgrupos con diferentes grados de obstrucción arterial y número de arterias involucradas, ninguna diferencia se observó entre el grupo con EAC y el grupo control. Los estudios en la literatura utilizan muestras mayores, principalmente para evaluarse la asociación entre polimorfismos y EAC o Hcy. Además de ello, la investigación de alteraciones en otras enzimas implicadas en el metabolismo de la Hcy y en las concentraciones plasmáticas de folato y vitaminas B₆ y B₁₂, e ingestión de vitaminas, podría suministrar datos más consistentes para la discusión sobre el efecto de los polimorfismos en las concentraciones de Hcy.

En resumen, existe una aparente asociación entre el polimorfismo VEGF C-2578A y el desarrollo de aterosclerosis. Sin embargo, esa asociación no es independiente de los factores de riesgo cardiovasculares convencionales.

Referencias

1. Howell WM, Ali S, Rose-Zerilli MJ, Ye S. VEGF polymorphisms and severity of atherosclerosis. *J Med Genet*. 2005; 42: 485-90.
2. Fleisch M, Billinger M, Eberli FR, Garachemani AR, Meier B, Seiler C. Physiologically assessed coronary collateral flow and intracoronary growth factor concentrations in patients with 1- to 3-vessel coronary artery disease. *Circulation*. 1999; 100: 1945-50.
3. Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation*. 1998; 98: 2108-16.
4. Tsurumi Y, Murohara T, Kraskinski K, Chen D, Witztenbichler B, Kearney M, et al. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med*. 1997; 3: 879-86.
5. Van Belle E, Tio FO, Chen D, Maillard L, Chen D, Kearney M, et al. Passivation of metallic stents after arterial gene transfer of phVEGF165 inhibits thrombus formation and intimal thickening. *J Am Coll Cardiol*. 1997; 29: 1371-9.
6. Bayer IM, Caniggia I, Adamson SL, Langille BL. Experimental angiogenesis of arterial vasa vasorum. *Cell Tissue Res*. 2002; 307: 303-13.
7. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res*. 2000; 37: 443-8.
8. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan JJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 260-4.
9. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, et al. Clinical use and rational management of homocysteine, folic acid, and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. *Z Kardiol*. 2004; 93: 439-53.
10. Welch GN, Upchurch GJR, Loscalzo J. Hyperhomocyst(e)inaemia and atherothrombosis. *Ann NY Acad Sci*. 1997; 811: 48-58.
11. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet*. 1999; 354: 407-13.
12. Verhoef P, de Groot LC. Dietary determinants of plasma homocysteine

Agradecimientos

Los autores agradecen a Celso Pereira Reis Filho por la gestión del banco de datos y al Prof. Dr. José Antônio Cordeiro por el análisis estadístico y reconocen el apoyo financiero de la Fundación de Amparo a la investigación del Estado de São Paulo (FAPESP).

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiación

El presente estudio fue financiado por FAPESP y CNPq.

Vinculación Académica

Este artículo forma parte de tesis de Doctorado de Alexandre Rodrigues Guerzoni, por la Facultad de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP.

concentrations. *Semin Vasc Med*. 2005; 5: 110-23.

13. Piscioti L, Cortese C, Gnasso A, Liberatoscioli L, Pastore A, Mannucci L, et al. Serum homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and cardiovascular disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2005; 179: 333-8.
14. Schwartz SM, Siscovick DS, Malinow MR, Rosendaal FR, Beverly RK, Hess DL, et al. Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Circulation*. 1997; 96: 81-9.
15. Tsai MY, Welge BG, Hanson NQ, Bignell MK, Vessey J, Schwichtenberg K, et al. Genetic causes of mild hyperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery diseases. *Atherosclerosis*. 1999; 143: 163-70.
16. Bova I, Chapman J, Sylantiev C, Karczyn AD, Bornstein NM. The A677V methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and carotid atherosclerosis. *Stroke*. 1999; 30: 2180-2.
17. Jee SH, Song KS, Shim WH, Kim HK, Suh I, Park JY, et al. Major gene evidence after MTHFR-segregation analysis of serum homocysteine in families of patients undergoing coronary arteriography. *Hum Genet*. 2002; 111: 128-35.
18. Arruda VR, Siqueira LH, Goncalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, et al. Prevalence of the mutation C677-->T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med*. 1998; 78: 332-5.
19. Haddad R, Mendes MA, Hoehr NF, Eberlin MN. Amino acid quantitation in aqueous matrices via trap and release membrane introduction mass spectrometry: homocysteine in human plasma. *Analyst*. 2001; 126: 1212-5.
20. Arnadottir M, Hultber, B, Vladov V, Nilsson-Ehle P, Thysell H. Hyperhomocysteinemia in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplantation*. 1996; 61: 509-12.
21. Abdel-Rahman SZ, Nouraldeen AM, Ahmed AE. Molecular interaction of 2,3-[14C]-acrylonitrile with DNA in gastric tissues of rat. *J Biochem Toxicol*. 1994; 9: 121-8.
22. Brogan JJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol*. 1999; 60: 1245-9.

23. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med.* 2001; 7: 425-9.
24. Srivatsa SS, Edwards WD, Boos CM, Grill DE, Sangiorgi GM, Garratt KN, et al. Histologic correlates of angiographic chronic total coronary artery occlusions. *J Am Coll Cardiol.* 1997; 29: 955-63.
25. Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, Soliman M, Butterfield C, Sylvan E, et al. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 4736-41.
26. Xu J, Turner A, Little J, Bleecker ER, Meyers DA. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum Genet.* 2002; 111: 573-4.
27. Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Am Coll Phys.* 2004; 141: 137-47.
28. Wittke-Thompson J, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet.* 2005; 76: 967-86.
29. Llorca J, Prieto-Salceda D, Combarros O, Dierssen-Sotos T, Berciano J. Competing risks of death and Hardy-Weinberg equilibrium in case-control studies of gene-disease association. *Gac Sanit.* 2005; 19: 321-4.
30. Williams JK, Armstrong ML, Heistad DD. Vasa vasorum in atherosclerotic coronary arteries: responses to vasoactive stimuli and regression of atherosclerosis. *Circ Res.* 1988; 62: 515-23.
31. Dedoussis GV, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysoshoou C, Skoumas J, Choumerianou D, et al. ATTICA Study Group. An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease. *Int J Cardiol* 2005;100:409-14.
32. Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, et al. Gene polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a coronary risk factor. *J Cardiol.* 1997; 29: 309-15.
33. Couffinhal T, Kearney M, Witzendichler B, Chen D, Murohara T, Losordo DW, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol.* 1997; 150: 1673-85.
34. Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ.* 2004; 11 (Suppl 1): 56-64.
35. Lima LM, Carvalho MG, Fernandes AP, Sabino Ade P, Loures-Vale AA, da Fonseca Neto CP, et al. Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase in subjects undergoing coronary angiography. *Arq Bras Cardiol.* 2007; 88 (2): 167-72.
36. Yilmaz H, Isbir S, Agachan B, Ergen A, Farsak B, Isbir T. C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene and serum homocysteine levels in Turkish patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Funct.* 2006; 24: 87-90.
37. Bonaa KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006; 354: 1578-88.
38. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, et al. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med.* 2006; 354: 1567-77.
39. The Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA.* 2002; 288: 2015-22.
40. Frederiksen J, Juul K, Grande P, Jensen GB, Schroeder TV, Tybjaerg-Hansen A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (C677T), hyperhomocysteinemia, and risk of ischemic cardiovascular disease and venous thromboembolism: prospective and case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. *Blood.* 2004; 104: 3046-51.
41. Huh HJ, Chi HS, Shim EH, Jang S, Park CJ. Gene-nutrition interactions in coronary artery disease: correlation between the MTHFR C677T polymorphism and folate and homocysteine status in a Korean population. *Thromb Res.* 2006; 117: 501-6.