



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES PARA LOS**  
**TRABAJADORES DEL ESTADO, ISSSTE**

**TESIS 170.2007**

**CORRELACIÓN ENTRE LA PROTEINA C REACTIVA Y EL**  
**POLIMORFISMO EN EL PROMOTOR DEL GEN CD14 C-308T EN**  
**UNA POBLACIÓN DE HOMBRES MEXICANOS**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**ESPECIALISTA EN CARDIOLOGÍA**

**P R E S E N T A**  
**FRANCISCO JAVIER CONTRERAS GERARDO**

**ASESOR DE TESIS**  
**DRA. ALEJANDRA MEANEY MARTÍNEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

**Dr. Eduardo Meaney**  
**Coordinador del servicio de Cardiología**  
**Hospital Regional “1° de Octubre”, ISSSTE**

---

**Dra. Alejandra Meaney Martínez**  
**Asesor de tesis**  
**Hospital Regional “1° de Octubre” ISSSTE**

---

**Dr. Gerardo de Jesús Ojeda Valdés**  
**Jefe de Enseñanza**  
**Hospital Regional “1° de Octubre” ISSSTE**

---

**Dr. Vicente Rosas Barrientos**  
**Jefe de Investigación Clínica**  
**Hospital Regional “1° de Octubre” ISSSTE**

## AGRADECIMIENTOS

A *Dios* por ayudarme a cumplir uno de mis más grandes anhelos.

A mi *esposa Maribal* por su amor incondicional, su compañía, su apoyo, su motivación y comprensión en todo momento. Eres parte de esto y mucho más.

A mis *padres* por su ejemplo y esfuerzo. Siempre estaré en deuda.

A mis *hermanos* por su respeto y cariño.

Al *Dr. Eduardo Meaney* por guiarme con su enseñanza, dedicación y confianza.

A la *Dra. Alejandra Meaney* por ser mi tutora y amiga.

A mis *abuelos* que aunque ya no están conmigo físicamente los tengo en mi corazón.

A mis abuelas por ser el pilar de siempre.

## Índice

<b>CAPÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
Resumen.....	4
Introducción.....	6
Epidemiología de la aterosclerosis en México.....	6
Factores de riesgo ateroscleroso.....	6
Aterosclerosis e inflamación.....	7
Citocinas.....	7
Reactantes de fase aguda.....	9
Proteína c reactiva y riesgo de enfermedad cardiovascular.....	9
Proteína C reactiva y enfermedad clínica cardiovascular.....	12
PCR y riesgo cardiovascular en sujetos aparentemente sanos de ambos sexos.....	13
Polimorfismos de genes inflamatorios.....	14
Asociación entre polimorfismos de moléculas inflamatorias e infarto del miocardio.....	15
Interleucina 6 (IL-6).....	15
Interleucina 1 (IL-1).....	15
Polimorfismos del gen del receptor CD14.....	16
Objetivos.....	17
Material y métodos.....	18
Población de estudio.....	18
Análisis molecular y detección de los polimorfismos.....	18
Expresión de CD-14.....	19
Realización de PCR.....	19
Análisis estadístico.....	19
Resultados.....	20
Conclusiones.....	22
Discusión.....	23
Bibliografía.....	25

## **Resumen**

### **Introducción**

La proteína C reactiva (PCR) es un predictor potente de enfermedad cardiovascular. Existe asociación entre el infarto del miocardio (IM) y polimorfismos del promotor del gen CD14 en diferentes sitios y poblaciones. Recientemente se describió un nuevo polimorfismo en el promotor del gen CD14 (T-308-C) en población Mexicana encontrando esta misma asociación. Se ha intentado demostrar que existe relación entre diferentes reactantes de fase aguda y polimorfismos sin lograrlo hasta el momento.

### **Objetivos**

1. Determinar los niveles de PCR en sujetos varones mexicanos sanos.
2. Caracterizar el sitio -315 y el sitio -159 del gen del receptor CD14 en sujetos varones mexicanos sanos.
3. Asociar los niveles de PCR con los diferentes genotipos y alelos encontrados en esta población de sujetos varones mexicanos sanos.

### **Material y métodos**

Se incluyeron sujetos del género masculino, mayores de 18 años de edad sin enfermedad sistémica y sin factores de riesgo coronario mayores, excluyéndose aquellos que presentaran anomalías en el perfil de lípidos o glucemia y a los que se les detectó hipertensión arterial sistémica.

### **Resultados**

Se estudiaron 50 hombres con una edad promedio de 37 años (+- 5.2), No se encontraron diferencias en cuanto a la genotipificación para los sitios -308 y -159 (-260). Los sujetos con haplotipo C-308T tuvieron significativamente PCR mas alta que el resto de los haplotipos encontrados ( $p=0.04$ ).

### **Conclusiones**

El 20% de nuestra población estudiada presentó niveles  $> 1\text{mg/L}$  de proteína C reactiva.

Los sujetos con haplotipo C/T tuvieron niveles significativamente más altos de PCR.

## **Introducción**

La aterosclerosis es una enfermedad de la civilización, que tiene un origen multifactorial, por un lado nuestra composición genética y por otro lado las nuevas condiciones ambientales propias de la civilización, bajo las cuales hemos vivido en los últimos 10,000 años. Prueba de ello lo constituye el hecho de que la aterosclerosis es sumamente rara en las poblaciones primitivas, que aún existen en remotos lugares del planeta, y que no comparten nuestro “moderno” estilo de vida. La prevalencia de los síndromes vasculares aterosclerosos como el infarto del miocardio (IM), el accidente vascular cerebral (AVC), la angina inestable (AI) y la enfermedad arterial periférica han ido en aumento creciente desde el inicio de la civilización hasta nuestros días, pero ha sido en los últimos 100 años cuando estos síndromes, particularmente los coronarios, han cobrado proporciones pandémicas. Este aumento es el resultado de la creciente prevalencia de sus determinantes más importantes, los factores de riesgo ateroscleroso, no sólo en los países industrializados, sino en los países en vías de desarrollo, como nuestro país.<sup>[1]</sup>

## **MARCO TEORICO**

### **Epidemiología de la aterosclerosis en México**

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte en nuestro país y de éstas la cardiopatía isquémica explica dos terceras partes. (INEGI 2005).<sup>[1]</sup> En 2004 la tasa de mortalidad por enfermedades cardíacas en nuestro país fue de 68.5 por cada 100,000 habitantes y de éstos el 64.4% se adjudicaron a la cardiopatía isquémica (CI). Los síndromes coronarios agudos (SCA) representan un serio problema de salud pública y son responsables de un gran número de hospitalizaciones anuales en nuestro país.<sup>[2]</sup>

### **Factores de riesgo ateroscleroso**

Se consideran factores de riesgo aterogénico aquellas condiciones que preceden a la aparición de la enfermedad, mantienen con ella una correlación estadísticamente significativa, poseen poder predictivo y tienen mecanismos etiopatogénicos plausibles, los cuales se basan en observaciones básicas y clínicas. Los factores de riesgo ateroscleroso se dividen en no modificables como: la edad, el género y la herencia, y en modificables (susceptibles de cambiar mediante diversas intervenciones). Estos últimos a su vez, se dividen en independientes ó mayores, debido a que por sí solos explican la aparición de la enfermedad aterosclerosa como: la hipercolesterolemia LDL, la hipertensión arterial sistémica, el tabaquismo, la diabetes mellitus y la hipocolesterolemia HDL; y en factores de riesgo menores o dependientes, ya que por sí solos no son capaces de explicar la aparición de la enfermedad y necesitan asociarse a uno de los mayores, estos son: la hipertrigliceridemia, la obesidad, el sedentarismo, la menopausia, la lipoproteína (a) elevada, factores trombogénicos, la hiperhomocisteinemia, infecciones y factores psicosociales.

Sin embargo, diversas series han mostrado que hasta 50% de las personas que presentan aterosclerosis no refiere presencia de alguno de estos factores convencionales. Por tal motivo, desde hace varios años, se ha estudiado el papel de otros factores en el desarrollo de la enfermedad. Un ejemplo de esto lo

constituye la proteína C reactiva (PCR), una sustancia que se encuentra en la sangre y la cual aumenta en presencia de inflamación. En los últimos años diversos estudios han mostrado que las cifras elevadas de PCR aumentan el riesgo de infarto del miocardio.<sup>[2]</sup>

### **Aterosclerosis e inflamación**

Actualmente se reconoce que la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria<sup>[3]</sup> inducida por alteraciones en el metabolismo de los lípidos, que provocan la entrada de éstos a la pared arterial en zonas de conflicto hidráulico, como las bifurcaciones. Se ha definido que la respuesta inflamatoria esta caracterizada por: 1) la infiltración y la activación de células mononucleares, 2) la secreción de citocinas proinflamatorias, 3) la activación del sistema humoral y 4) la apoptosis e inducción de procesos reparadores.<sup>[4]</sup>

Se ha observado que diversas moléculas que intervienen en el proceso inflamatorio dentro de las placas ateroscleróticas, como las citocinas, los reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR), el fibrinógeno, la proteína sérica amiloide A y la neopterinina, aumentan sus concentraciones séricas durante los SCA y han sido propuestas como marcadores de enfermedad aterosclerótica activa.<sup>[5]</sup>

### **Citocinas**

Son las principales disparadoras de la síntesis de reactantes de fase aguda. Son moléculas peptídicas que inducen la respuesta inflamatoria actuando sobre receptores específicos de alta afinidad.<sup>[6]</sup> La mayoría de las citocinas son moléculas multifuncionales que tienen diferentes acciones según las células estimuladas. En realidad, los efectos inducidos por la citocinas dependen de las características de la célula y del entorno celular. Habitualmente, los efectos de las diferentes citocinas se sobrepone entre sí y solamente algunas tienen un solo y definido efecto. Actúan localmente, en forma autócrina y parácrina, y son sintetizadas como respuesta fisiológica ante el daño tisular. Sus principales acciones se podrían sintetizar como coordinadoras de la eliminación de los

microorganismos invasores, de las noxas injuriantes y de los tejidos dañados por sus efectos, y encargadas de la modulación del sistema inmunitario. [7]

Las acciones proinflamatorias de citocinas como las interleucinas IL-1 e IL-6 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) son moduladas por otras citocinas con actividad resultante antiinflamatoria, como las interleucinas IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-18 y el IFN- $\alpha$ . Las citocinas inducen la producción de una variedad de mediadores inflamatorios, como el fragmento del complemento C5a y el factor de activación plaquetaria, los cuales acrecientan los efectos de las citocinas e inducen la síntesis de otros mediadores inflamatorios y de otras citocinas que pueden tener una acción estimulante, depresora o inhibitoria del proceso inflamatorio, dependiendo de las características y de las circunstancias particulares de cada situación. De esta manera, controlan, suprimen o estimulan la inflamación. [8]

Diversas investigaciones han demostrado la correlación entre aterosclerosis y concentraciones plasmáticas de algunas citocinas, por lo que se ha propuesto que éstas pueden servir para identificar pacientes con riesgo de accidentes vasculares. [9]

### **Reactantes de fase aguda**

Los reactantes de fase aguda son marcadores sensibles, pero no específicos de inflamación sistémica. Son proteínas sintetizadas por los hepatocitos ante la estimulación de citocinas, [como lo demostró Koj en 1974], principalmente por la IL-1, la IL-6 y el TNF- $\alpha$ . [9-11] Tanto la IL-6 como TNF- $\alpha$  son sintetizados por los macrófagos activados, y su producción y liberación se incrementan en respuesta al estrés metabólico, a la infección y a la inflamación. Recientemente se ha observado que los reactantes de fase aguda como el fibrinógeno, la proteína amiloide sérica A y la PCR están aumentados en los pacientes con enfermedad coronaria y los predisponen a desarrollar accidentes vasculares adversos. [12-15] Varios estudios han confirmado el valor pronóstico de estos marcadores inflamatorios incluso en sujetos aparentemente sanos. [16, 17, 18]

El primer reactante de fase aguda evaluado sistemáticamente como marcador de riesgo cardiovascular fue el fibrinógeno, [19] con importantes

observaciones de corte epidemiológico que asociaron sus concentraciones elevadas con eventos cardiovasculares. <sup>[20-25]</sup> Los factores de riesgo cardiovascular convencionales, como el tabaquismo, <sup>[26]</sup> la edad, <sup>[27,28]</sup> el índice de masa corporal elevado <sup>[28]</sup> y el uso de anticonceptivos <sup>[29]</sup> elevan la concentración de fibrinógeno sérico. Otros reactantes de fase aguda como la proteína amiloide A sérica, <sup>[30,31]</sup> el ácido siálico, <sup>[32-34]</sup> la albúmina <sup>[34]</sup> y la ceruloplasmina, <sup>[35]</sup> también se acompañan de un aumento del riesgo cardiovascular. Sin embargo, entre los reactantes de fase aguda, el marcador inflamatorio que más se ha estudiado y que aparentemente ha captado más la atención de los investigadores alrededor del mundo es la proteína C reactiva. <sup>[36]</sup>

### **Proteína c reactiva y riesgo de enfermedad cardiovascular**

La proteína C reactiva (PCR) es quizá el mediador inflamatorio asociado al desarrollo y a la progresión de la enfermedad ateroclerótica mejor estudiado. La PCR, compuesta de 23 kD, es un miembro de la familia de proteínas naturales de la inmunorespuesta del pentraxín, producida principalmente en el hígado en respuesta a la citocina IL-6, es un reactivo clásico de la fase aguda y se había pensado en él inicialmente como un marcador de la cascada inflamatoria. Sin embargo, ahora se cree cada vez más que la PCR desempeña un papel activo en la aterogénesis, participando desde el reclutamiento inicial de los leucocitos circulantes a la pared arterial hasta la ruptura eventual de la placa inestable. <sup>[37]</sup>

Evidencia considerable apoya la visión que la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria mediada por una amplia gama de citocinas, de interleucinas, de factores de crecimiento, de receptores de superficie y de diversos tipos celulares. <sup>[38]</sup> La severidad de la inflamación vascular parece determinar la estabilidad y la inestabilidad relativa de la placa ateromatosa, así como los índices de progresión de la enfermedad. <sup>[39]</sup>

El desarrollo temprano de la lesión ateromatosa consiste en la adherencia del monocito y la transmigración a través del, endotelio vascular. Datos recientes in vitro sugieren que la PCR participa en estos dos procesos, por un lado retroalimentando positivamente las moléculas de adherencia de la superficie de la

célula endotelial tales como la molécula de adherencia intercelular-1 (ICAM-1), la molécula de adherencia de la célula vascular-1 (VCAM-1), y la E-selectina,<sup>[39]</sup> y por otro lado estimulando la síntesis de la proteína quimioattractante del monocito-1 (MCP-1).<sup>[40]</sup> La diferenciación de monocitos hacia macrófagos y la acumulación subsecuente de lípidos conduce a la formación de células espumosas y de la estría grasa. La PCR se identifica en placas ateroscleróticas nacientes y se ha demostrado que se une al receptor CD32 para promover el barrido de la lipoproteína de baja densidad (LDL) por los macrófagos mediado por este receptor.<sup>[41]</sup> La proliferación de las células del músculo liso y el reclutamiento continuo de células inflamatorias crean una placa madura con un recubrimiento fibroso que separa la acumulación protrombótica de lípido de flujo de sangre luminal. El adelgazamiento del recubrimiento fibroso incrementa el riesgo de ruptura de la placa y de eventos isquémicos agudos.<sup>[42]</sup>

Además de aumentar la expresión de las moléculas de adherencia, la PCR también puede contribuir a la disfunción de la célula endotelial reduciendo la producción de óxido nítrico (NO), disminuyendo la capacidad fibrinolítica, y aumentando la producción de endotelina-1. El NO es un importante vasodilatador y disminuye la oxidación de las LDL, la agregación plaquetaria, y la proliferación de músculo liso. Se ha reportado que la PCR reduce la expresión de la sintetasa de NO endotelial<sup>[43]</sup> y la liberación de NO.<sup>[44]</sup> La actividad disminuida de NO inhibe la angiogénesis dependiente del factor de crecimiento vascular, un importante mecanismo compensatorio en isquemia crónica. La PCR parece aumentar la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno endotelial-1,<sup>[45]</sup> una proteína que inhibe la fibrinólisis y aumenta el riesgo trombótico.<sup>[46]</sup> También se ha reportado que la PCR estimula la producción de endotelina-1,<sup>[47]</sup> un potente vasoconstrictor e inductor de la inflamación de la pared del vaso, del crecimiento celular y de la trombosis.

El disparador para la respuesta inflamatoria inicial sigue siendo confuso. Se ha sugerido que son responsables las fuentes infecciosas distales (p. ej., *Helicobacter pylori*) que llevan a la elevación de las citosinas circulantes, o las fuentes infecciosas locales dentro de la placa por organismos intracelulares (p. ej.,

*Chlamydia pneumoniae* o *citomegalovirus*). Sin embargo, la presencia de los anticuerpos a éstos y a otros agentes infecciosos no son predictores constantes de enfermedad cardiovascular (ECV) insidiosa en estudios prospectivos.<sup>[47]</sup>

No se sabe cómo la PCR circulante puede atravesar la barrera endotelial e incorporarse al espacio subendotelial. Sin embargo, células del músculo liso y macrófagos dentro de la placa ateromatosa sintetizan PCR *in situ*.<sup>[47]</sup> De hecho, los niveles de RNAm de la PCR en la placa son de siete a diez veces más altos que los niveles encontrados en el hígado y los vasos sanguíneos normales, respectivamente. Además del hígado, otra fuente importante de PCR circulante es el tejido adiposo. El tejido adiposo también produce adiponectina, una citosina con características antiinflamatorias. La adiponectina disminuye la producción de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  del tejido adiposo, inhibe la expresión de la molécula de adherencia endotelial, y disminuye la actividad de barrido de lípidos de los macrófagos.<sup>[48]</sup> En pacientes con EC, los niveles de PCR se correlacionan negativamente con los niveles de adiponectina, lo que sugiere una relación adicional entre la PCR alta y el riesgo coronario.<sup>[48]</sup>

La evidencia de laboratorio para un papel etiológico de la PCR en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica no es definitiva todavía. Sin embargo, dado el número de procesos pro-aterogénicos en que está implicada la PCR, el apoyo para esta conclusión está aumentando rápidamente. En tanto los detalles del mecanismo que sostiene el papel de la PCR en la aterogénesis se hacen más convincentes, se abrirán nuevas posibilidades terapéuticas para prevenir y tratar las variadas manifestaciones clínicas de la aterosclerosis.<sup>[48]</sup>

### **Proteína C reactiva y enfermedad clínica cardiovascular**

La PCR está asociada a eventos vasculares recurrentes y muerte entre pacientes con angina de pecho estable, isquemia coronaria aguda, o una historia de IM.<sup>[49]</sup> Más de una docena de estudios epidemiológicos con períodos de seguimiento de entre 3 y 20 años también han encontrado que una sola medición de PCR es un predictor fuerte de IM, embolia, enfermedad vascular periférica y muerte cardiovascular en personas sin historia previa de ECV.<sup>[48,49,50]</sup> En general,

los participantes con niveles basales de PCR en la cuartila superior de la distribución de la muestra, tienen dos a tres veces mas probabilidad de sufrir un evento vascular futuro que aquellos en la cuartila inferior de PCR. La asociación entre PCR y los eventos vasculares subsecuentes en la mayoría de los casos es independiente de la edad, del tabaquismo, de la hipertensión, de dislipidemia y de la diabetes, que son los factores de riesgo convencionales evaluados en la práctica diaria e incluidos en los algoritmos globales de predicción cardiovascular, tal como lo demuestra el estudio de Framingham.<sup>[50]</sup>

Muchos de los datos disponibles se han derivado de estudios jerarquizados de casos y controles, que permiten la estimación de riesgos relativos pero no de riesgos no absolutos de enfermedad dentro de los estratos de factores de riesgo. Sin embargo, recientemente se han publicado datos de supervivencia libre de eventos de las cohortes a gran escala, permitiendo una interpretación directa de los niveles de PCR en términos de quintiles basados en la población o puntos simples de corte.<sup>[51]</sup> El último reporte muestra que los niveles de PCR de menos de 1, 1 a 3, y mayor de 3 mg/L representan grupos de bajo, moderado y alto riesgo, respectivamente, esto proporciona utilidad predictiva comparable al primer estudio y tienen probablemente mayor interés clínico. La división de la PCR en menos de 1, 1 a 3 y mayor de 3 mg/L agrega información pronóstica en todos los niveles de riesgo basados tanto en los puntos de corte de LDL actuales del Programa Nacional de Educación del Colesterol (*National Cholesterol Education Program - NCEP*)<sup>[52,56]</sup> como en el cálculo de la calificación de riesgo de Framingham.<sup>[50]</sup>

### **PCR y riesgo cardiovascular en sujetos aparentemente sanos de ambos sexos**

En un subestudio del ensayo MRFIT (*Multiple Risk Factor Intervention Trial*) que incluyó 12,866 hombres aparentemente sanos seguidos durante 17 años, se observó por primera vez una significativa asociación entre concentraciones de PCR y muerte por cardiopatía isquémica.<sup>[53]</sup> Este subestudio incluyó las primeras 50 muertes por enfermedad coronaria en no fumadores y las primeras 100

muerter en fumadores, las primeras 35 muerter por infarto de miocardio en no fumadores y las primeras 65 en fumadores y se compararon con testigos de edades y tabaquismo semejantes. Se observó que los sujetos aparentemente sanos y que no habían padecido eventos isquémicos tenían una concentración plasmática de PCR de 2.0 mg/l, contra 2.7 mg/l en los que sobrevivieron a un infarto de miocardio y 3.34 mg/l en los fallecidos, con una diferencia entre el cuartilo mas alto y el más bajo de 2.8 (1.4-5.4). En el Physicians' Health Study se observó una relación significativa entre cifras de PCR y riesgo cardiovascular.<sup>[54]</sup> En este ensayo, 543 pacientes que tuvieron un evento cardiovascular durante el seguimiento (EVC isquémico ó hemorrágico, trombosis venosa profunda, IM ó muerte de causa cardiovascular) fueron comparados con 543 controles aparentemente sanos de edades y hábitos tabáquicos semejantes que no padecieron eventos vasculares. Los miembros de ambos grupos fueron previamente distribuidos de manera aleatoria para recibir ácido acetil salicílico o placebo. En los sujetos control aparentemente sanos que no sufrieron eventos la PCR basal fue de 1.13 mg/l, mientras que en los que padecieron eventos cardiovasculares alcanzó 1.40 mg/l ( $p < 0.001$ ). Los hombres en el cuartilo más alto tuvieron un riesgo relativo de sufrir IM 2.9 veces mayor que los que se encontraban en el cuartilo más bajo. El tratamiento con aspirina se asoció con una significativa reducción de eventos en los hombres en el cuartilo más alto de PCR (55.7% de reducción de riesgo,  $p = 0.02$ ). En resumen, este estudio demostró que la concentración basal de PCR es un predictor de riesgo de EVC e IM, y que el riesgo de tener un primer infarto de miocardio en pacientes tratados con aspirina es directamente dependiente de los niveles basales de PCR. Resultados similares se obtuvieron en el Honolulu Heart Program.<sup>[55]</sup>

### **Polimorfismo de genes inflamatorios**

Dado que los factores de riesgo (FR) convencionales sólo explican a lo sumo la mitad de los casos, se han buscado nuevos factores etiológicos en el ámbito de la genética molecular. Los polimorfismos de un sólo nucleótido son mutaciones del ácido desoxirribonucleico (ADN), que pueden alterar la función de

la proteína codificada, son frecuentes y pueden ser un factor de riesgo genético cuando el organismo se enfrenta a determinados factores ambientales (colesterol, estrés, tabaco, etc.). Los avances recientes en la biología molecular han facilitado la detección de numerosos polimorfismos que pueden tener un efecto patógeno, y han hecho sugerir la hipótesis de que la suma de polimorfismos desfavorables y un marco ambiental propicio puede facilitar la aparición de la aterosclerosis y de la enfermedad coronaria en particular, enfermedad típicamente poligénica y multifactorial<sup>[56,57]</sup>.

Es bien sabido desde los años sesenta que el infarto del miocardio (IM) y en general toda la patología aterosclerosa, tienen un componente hereditario importante. Así se desprende de los numerosos estudios realizados en familias y en gemelos,<sup>[56]</sup> que han descrito el riesgo de tener un hermano gemelo o un pariente afectado de EC.

La identificación de los genes responsables del aumento del riesgo, sin embargo, ha sido un proceso lento y difícil, acelerado en la última década gracias a los avances de la biotecnología, que han facilitado la detección de los cambios en la secuencia del ADN que pueden tener un efecto patógeno.<sup>[58]</sup>

### **Asociación entre polimorfismos de moléculas inflamatorias e infarto del miocardio**

Los polimorfismos hasta ahora estudiados y con los que se ha buscado asociación con la inflamación o aterosclerosis son:

#### **Interleucina 6 (IL-6)**

La IL-6 ocupa un papel central en la génesis de la reacción inflamatoria sistémica y la respuesta de la fase aguda, pues es la única citocina que puede estimular la síntesis de todas las demás proteínas que intervienen en la respuesta inflamatoria. Se ha descrito un polimorfismo en el promotor del gen (G/C -174) de la IL-6, que disminuye la capacidad de producción de IL-6 y puede amortiguar la respuesta inflamatoria. Los niveles circulantes basales de IL-6 en el genotipo CC son inferiores en un 50% a los del genotipo GG, y los estudios preliminares demuestran que el riesgo de IM se reduce a la mitad (RR 0.54) Se ha

comprobado *in vitro* e *in vivo* que las variaciones de la producción de IL-6 en respuesta a los estímulos de LPS o IL-1 pueden dar origen a diferencias importantes en la producción de fibrinógeno, de moléculas de adhesión del endotelio o de la agregación plaquetaria.<sup>[57]</sup>

### **Interleucina 1 (IL-1 $\alpha$ )**

También podría influir en la progresión de la aterosclerosis los polimorfismos de la interleucina 1 (IL-1): el polimorfismo C/T -511 del gen de la IL-1 $\alpha$  y el polimorfismo del antagonista del receptor R-IL-1 (aR-IL-1).<sup>[58]</sup> Se ha descrito que los pacientes seropositivos a *Chlamydia* son más propensos a padecer IM si son portadores del genotipo IL-1 C/C y/o el alelo 2- o 3-repeat allele del aR-IL-1. Al parecer el efecto aterogénico de la infección sólo se manifestaría en presencia de este polimorfismo, que confiere la susceptibilidad necesaria. Esto podría explicar los resultados a veces conflictivos de los estudios sobre la asociación entre *Chlamydia* y la enfermedad coronaria.<sup>[58]</sup>

### **Polimorfismos del gen del receptor CD14**

Otras líneas de investigación se centraron en el estudio de un polimorfismo localizado en el promotor del gen que codifica para el receptor CD14. Este receptor es una glicoproteína de 55kD de peso molecular, rica en leucina, expresada por los monocitos y los macrófagos,<sup>[58, 59,60]</sup> que reconoce entre otros ligandos al lipopolisacárido (LPS o endotoxina).<sup>[60]</sup> El reconocimiento de sus ligandos, activa al macrófago, que ya activado produce TNF $\alpha$ , IL1, interleucinas 6 y 8 (IL6, IL8), interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), factores de inhibición de la migración, quimiocinas y especies reactivas del oxígeno. La proteína madura se encuentra presente en dos isoformas, una membranal y otra soluble. Las células endoteliales y los miocitos vasculares son activados a través de la forma soluble.<sup>[61]</sup> Se ha reportado un polimorfismo en el promotor del gen CD14 asociado con SICA, en tres poblaciones: alemana, checa y japonesa localizado en el sitio -159pb.<sup>[61]</sup> Este polimorfismo se caracteriza por la sustitución de una citosina por una timina, y el genotipo homocigoto TT en las tres posiciones se asoció con IM. También se describió un fenotipo asociado al genotipo TT, caracterizado por el aumento en la

expresión del receptor a nivel de la membrana de los monocitos. Recientemente se demostró que los monocitos con el genotipo homocigoto TT, retados con concentraciones mínimas de LPS, producían cantidades mayores de TNF $\alpha$ , cuando se les comparó con monocitos que poseían los genotipos CT y CC. <sup>[61]</sup>

En población mexicana recientemente se describió otro sitio polimórfico en el promotor del gen que codifica para el receptor CD14 localizado en la posición -308 y donde también hay un cambio de citosina por timina. El alelo C y el genotipo homocigoto TT se asociaron a IM en hombres mexicanos. Además se observó que los varones sanos con genotipo homocigoto CC tenían aumento significativo de la expresión de CD14 a nivel de membrana cuando se compararon con los sujetos homocigotos TT. Estos datos sugieren que los sujetos con genotipo homocigoto CC pudieran tener un estado proinflamatorio, por este motivo decidimos investigar si existía diferencia en los niveles de PCR y los diferentes alelos y genotipos de este nuevo sitio y de los ya descritos en una población de sujetos mexicanos, varones sanos.

## **Objetivos**

1. Determinar los niveles de PCR en sujetos varones mexicanos sanos
2. Caracterizar el sitio -308 y el sitio -159 del gen del receptor CD14 en sujetos varones mexicanos sanos
3. Asociar los niveles de PCR con los diferentes genotipos y alelos encontrados en esta población de sujetos varones mexicanos sanos

## **Material y métodos**

### **Población de estudio**

Los sujetos estudiados fueron reclutados de la Unidad Cardiovascular del Hospital Regional 1ro de Octubre del ISSSTE, en México, D. F., previa aprobación del protocolo por el Comité de Ética del Hospital. Antes de iniciar el estudio se obtuvo la firma de los pacientes en el consentimiento informado. A los pacientes se les realizó una historia cardiovascular completa, con énfasis en antecedentes familiares de diabetes mellitus, cardiopatía isquémica e hipertensión arterial, así como antecedentes personales sobre diabetes mellitus, hipertensión arterial, dislipidemias, cardiopatía isquémica y tabaquismo. También se les realizó un examen físico completo que incluyó la medición de la presión arterial, el peso y la talla. El índice de masa corporal se obtuvo al dividir el peso expresado en kilogramos por el cuadrado de la talla en metros. A todos los pacientes se les tomó una muestra de sangre de 20cc, la cual se utilizó para la determinación de glucemia de ayuno, colesterol total, colesterol de alta densidad (HDL-Col) y triglicéridos, posterior a 12 horas de ayuno y bajo los procedimientos habituales de laboratorio. El colesterol de baja densidad (LDL-Col) se obtuvo a partir de la fórmula de Friedwald, además se tomó mediante el suero de la misma muestra la determinación de PCR de alta sensibilidad (medición por anticuerpos monoclonales)

Se incluyeron sujetos del género masculino, mayores de 18 años de edad sin enfermedad sistémica y sin factores de riesgo coronario, excluyéndose aquellos que presentaran anomalías en el perfil de lípidos o glucemia y a los que se les detectó hipertensión arterial sistémica.

### **Análisis molecular y detección de los polimorfismos**

Se obtuvo el ADN genómico de las células mononucleares mediante un kit comercial de BIO-RAD (catálogo 732-6340 USA). El ADN obtenido se utilizó como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los siguientes iniciadores:

5'-TTGGTGCCAACAGATGAGGTTCAC-3', 5'-TTCTTTCCTACACAGCGGCACCC-3'<sup>23</sup>. Esta se llevó a cabo en un volumen

total de 25µl, que contenía: 100 a 200ng de ADN, 0.5 U *Taq* polimerasa

(Invitrogen), 0.5 $\mu$ M de cada iniciador, 200 $\mu$ M de cada dNTP (Roche), y 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen). El fragmento obtenido fue de 560pb, posteriormente se clono este fragmento en un vector bluescript y se secuenció. Se observó que existían dos sitios de reconocimiento para la enzima Hae III, los descritos con anterioridad en las posiciones -159 y -260, y un tercer sitio localizado a -315pb. Se decidió utilizar tres juegos de iniciadores,<sup>23</sup> que permitieran el análisis de cada uno de estos sitios. Las condiciones de la PCR para todas las reacciones fueron: un ciclo de desnaturalización a 95°C por 5 minutos; 40 ciclos que incluyeron 40 segundos a 92.3°C, 35 segundos a 59.5°C y 50 segundos a 71.5°C. El paso final se prolongo por 5 minutos. Se utilizó un termociclador BIO-RAD.

### **Expresión de CD14**

Se determinó la densidad del receptor CD14 en los monocitos mediante citometría de flujo con anticuerpos monoclonales específicos (Pharmigen), de acuerdo al protocolo estándar.<sup>[28]</sup>

### **Realización de PCR**

Se realizó la medición para PCR mediante anticuerpos monoclonales específicos contra PCR con determinación cuantitativa mediante inmunonefelometría utilizando el procesador tipo General Electric 240 C.

### **Análisis Estadístico**

Los datos fueron analizados mediante las técnicas habituales de la estadística descriptiva, para datos normalmente distribuidos. A todos los valores numéricos continuos, se les calculó el promedio y la desviación estándar. En el caso de estadística inferencial para variables continuas se realizó comparación de medias a través de  $t$  pareada y para las variables discretas comparación de proporciones a través de  $\chi^2$  cuadrada, considerando una significancia estadística con un valor de  $p$  menor de 0.05.

## Resultados

Se estudiaron 50 hombres con una edad promedio de 37 años ( $\pm 5.2$ ), sin factores de riesgo cardiovascular, las características generales de la población se muestran en la tabla 1. No se encontraron diferencias en cuanto a la genotipificación para los sitios -308 y -159 (-260) lo cual se muestra en la tabla 2. Los sujetos con haplotipo C-308T tuvieron significativamente PCR mas alta que el resto de los haplotipos encontrados ( $p=0.04$ ) tabla 3.

**Tabla 1. Características somatométricas y de laboratorio de la población estudiada**

Variables	Media (DE)
Edad (años)	37 (5.2)
Índice de masa corporal (IMC)	22 (1.1)
Colesterol total (CT)	176 (30.0)
Colesterol HDL (C-HDL)	45 (8.5)
Colesterol LDL (C-LDL)	80 (11.0)
Triglicéridos (TG)	145 (32.0)
Proteína C Reactiva (PCR)	1.3 (3.0)

En la tabla 2 se observa los genotipos para los sitios -308 y -159/-260 en nuestra población.

Genotipos		Sujetos (%)
-308	CC	8 (16)
	CT	14 (28)
	TT	7 (14)
-159	CC	6 (12)
	CT	10 (20)
	TT	5 (10)

En el cuadro 3 se observa la relación entre los niveles promedio de PCR y los diferentes haplotipos en nuestra población.

<b>Haplotipos</b>		<b>PCR (mg/L) promedio (DE)</b>	<b>t</b>
<b>-308</b>	<b>-159</b>		
<b>C</b>	<b>T</b>	<b>2.57 (4.63)</b>	<b>0.02</b>
<b>T</b>	<b>T</b>	<b>0.53 (0.54)</b>	<b>NS</b>
<b>T</b>	<b>C</b>	<b>0.31 (0.00)</b>	<b>NS</b>
<b>C</b>	<b>C</b>	<b>0.31 (0.00)</b>	<b>NS</b>

## **Conclusiones**

1. El 20% de nuestra población estudiada presentó niveles  $> 1\text{mg/L}$  de proteína C reactiva
2. Los sujetos con haplotipo C/T tuvieron niveles significativamente más altos de PCR

## Discusión

El receptor CD14 es un importante mediador en la respuesta inflamatoria y su expresión se encuentra bajo control genético, diversos estudios hasta la fecha han mostrado la asociación de polimorfismos de un solo nucleótido en el promotor de este gen e infarto del miocardio en al menos dos poblaciones, una checa y otra japonesa.<sup>[61]</sup> Estudios recientes realizados en nuestro país (comunicación verbal) describieron la presencia de otro sitio polimórfico localizado río arriba del previamente descrito que también se asoció con infarto del miocardio en una población masculina mexicana. El polimorfismo (C-159T) previamente descrito y el encontrado en población mexicana (T-308C) comparten el fenotipo de mayor expresión del receptor CD14 de membrana. Estudios recientes han observado asociación entre los niveles de proteína C reactiva y diversos alelos, en uno de ellos realizado en población checa se observó que sujetos del género masculino con el genotipo homocigoto TT para la posición -159 tenían niveles más altos de PCR cuando se compararon con sujetos con genotipo CC para ese mismo sitio.<sup>[61]</sup> Otro estudio realizado en población alemana, mostró que pacientes con genotipo homocigoto TT para la posición -260 tenían niveles más elevados de CD14 soluble (reactante de fase aguda) en comparación con sujetos con los otros genotipos, y esta elevación se correlacionó con niveles más altos de PCR. Esta observación no fue hecha en los controles, sin embargo se observó una tendencia también en este grupo.<sup>[59,60]</sup> En nuestro estudio caracterizamos los dos sitios polimórficos en nuestros sujetos sanos (-308 y -159/-260), y de manera muy interesante observamos que los sujetos con haplotipo C/T, que en la literatura se ha asociado con infarto del miocardio, tenían los niveles más elevados de proteína C reactiva de forma significativa, cuando se les comparo con los otros haplotipos. Estos sujetos además tenían aumento de CD14 a nivel de membrana (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que los individuos portadores de los alelos asociados a infarto del miocardio (C-308 y T-159/-260) pudieran tener un estado proinflamatorio motivado por una hiperactividad de monocitos mediada por CD14 que unido a TLR4 se sabe que es capaz a través de múltiples vías de activar al factor NF $\kappa$ B que a su vez es el responsable de la amplificación de la respuesta

inflamatoria mediante la activación de genes como el de  $\text{TNF}\alpha$  e IL6, esta a su vez actuando sobre el hepatocito es la responsable directa de la producción de PCR.

Es igualmente interesante notar que el 20% de nuestra población tuvo niveles aumentados de PCR ( $> 1\text{mg/l}$ ) ya que diversos estudios han mostrado que para otras poblaciones estos porcentajes se encuentran alrededor del 10%.<sup>[62]</sup> Es importante recalcar que los individuos que participaron en este estudio se encontraban clínicamente libres de procesos infecciosos, aunque no es posible descartar procesos infecciosos subclínicos, que podrían haber motivado el aumento de PCR. Sin embargo, algunos estudios realizados en población mexicana de la Ciudad de México, parecida a la de nuestro estudio, han mostrado datos similares, sugiriendo que individuos mexicanos ciudadanos pudieran estar inflamados de forma crónica.<sup>[62]</sup>

Algunas de las limitaciones de este estudio son el tamaño pequeño de la muestra, sin embargo las observaciones realizadas en cuanto a la asociación con infarto del miocardio en población mexicana fueron realizadas con sujetos muy similares que compartían la misma área geográfica. Este estudio sienta pues las bases para el desarrollo de investigaciones más grandes que involucren un tamaño de muestra mayor y que investiguen los mecanismos moleculares que se encuentran detrás de estos fenómenos, ya que el concepto de la variabilidad genética individual desempeña un papel determinante en el riesgo coronario, y resulta muy atractivo, sobre todo si se tiene en cuenta que los factores de riesgo convencionales solo justifican del 30 al 50%<sup>[63]</sup> de los casos de enfermedad coronaria.

## Bibliografía

1. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI 2006). [www. INEGI.gob.mx](http://www.INEGI.gob.mx).
2. Meaney E. **Programa de Actualización Continua para Cardiólogos (PAC)**. Parte B- Libro 4, Pags. 10-47; 1998.
3. Fraser GE, Sabaté J, Beeson WL, Strahan TM. **Possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease: The Adventist Health Study**. *Arch Intern Med* 1992; 152: 1416-24.
4. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, et al. **Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women. Restrospective cohort study**. *Br Med J* 1998; 317: 1341-45.
5. Kardoulas DG, Katsamouris AN, Gallis PTh, et al. **Ultrasonographic and histologic characteristics of syntom-free and syntomatic carotid plaque**. *Cardiovasc Surg* 1996; 4: 580-90.
6. Sowers JR. **Effects of statins on the vasculature: Implications of aggressive lipid management in the cardiovascular metabolic syndrome**. *Am J Cardiol* 2003; 91 (Suppl 4-A): 14B-22B.
7. Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. **Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: The Pravastatin Inflammation/CRP Evaluation (PRINCE): A randomized trial and cohort study**. *JAMA* 2001; 286: 64-70.
8. Libby P, Aikawa M. **Stabilization of atherosclerotic plaques: New mechanisms and clinical targets**. *Nay Med* 2002; 8: 1257-62.
9. Forrester JS. **Prevention of plaque rupture: A new paradigm of therapy**. *Ann Intern Med* 2002; 137: 823-33.
10. Kjekshus J, Pedersen TR. **Reducing the risk of coronary events: Evidence from the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4s)**. *Am J cardiol* 1995; 71: 64C-68C.
11. Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, Schleger B, Jick H. **HMG-CoA reductase inhibitors and the risk fractures**. *JAMA* 2000; 283: 3205-10.
12. Young-Xu Y, Chan A, Liao JK, Ravid S, Blatt CM. **Long term statin use and psychological well-being in the elderly**. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41(Supll A): 82 (Abstract # 1040).
13. Young-Xu Y, Blatt CM, Bedell S, Graboys T, Bilchik B, Ravid S. **Statin reduce the incidence of atrial fibrillation in patients with coronary artery disease**. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41(Supll A): 122 (Abstract # 1181).
14. Ferrier KE, Muhlmann MH, Baguet JP, Cameron JD, Jennings JL, Dart AM, Kingwell BA. **Intensive cholesterol reduction lowers blood pressure and large artery stiffness in isolated systolic hypertension**. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 1020-25.
15. Borghi C, Prandin MG, Costa FV, Bacchelli S, Degli esposti D, Ambrosini E. **Use of statins and blood pressure control in treated hypertensive patients with hypercholesterolemia**. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35: 549-555.
16. Nazzaro P, Manzari M, Merlo M, y cols. **Distinct and combined vascular effects of ACE blockade and HMG-CoA reductase inhibition in hypertensive subjets**. *Hypertension* 1999; 33: 719-25.
17. Esper RJ, Stein E, Lemme L, for the Cerivastatin/Bezafibrate Latin America Study Group. **Efficacy and safety of cerivastatin/bezafibrate combination therapy for dyslipidaemia**. *Diabetología* 1992; 42 (Suppl 1): A-68 (Abstract).

18. Pitt B, Waters D, Beown WB, von Boven AJ, Schwartz L, Title LM, Eisenberg D, Shurzinske L, McCormick LS, for AVERS investigators. **Aggressive lipid-lowering therapy compared with angioplasty in stable coronary artery disease.** *N Engl J Med* 1999; 341: 70-76.
19. Brown MS, Goldstein JL. **Heart attacks: Gone with the century?** *Science* 1996; 272: 629.
20. Ridker PM. **Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention.** *Circulation* 2003; 107: 363-69.
21. Geng YJ, Libby P. **Progression of atheroma: a struggle between death and procreation.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1370-80.
22. Libby P, Ridker PM, Maseri A. **Inflammation and atherosclerosis: Revisión global al día del papel de varios mediadores y células inflamatorias durante cada fase de la maduración y progresión de la placa ateromatosa.** *Circulation* 2002; 105: 1135-43.
23. Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, et al. **Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs.** *Circulation* 2001; 103: 2531-34.
24. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. **Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells.** *Circulation* 2000; 102: 2165-68.
25. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. **C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: Implication for atherosclerosis.** *Circulation* 2001; 103: 1194-97.
26. Wang CH, Li SH, Weisel RD, et al. **C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle.** *Circulation* 2003; 107: 1783-90.
27. Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, et al. **Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells.** *Circulation* 2002; 106: 1439-41.
28. Verma S, Wang CH, Li SH, et al. **A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis.** *Circulation* 2002; 106: 913-19.
29. Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, et al. **Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease.** *Circulation* 2000; 102: 1000-06.
30. Devaraj S, Xu DY, Jialal I. **C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor -1 expression and activity in human aortic endothelial cells: Implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis.** *Circulation* 2003; 107: 398-404.
31. Verma S, Li SH, Badiwala MV, et al. **Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein.** *Circulation* 2002; 105: 1890-96.
32. Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, et al. **Complement and atherogenesis : binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2348-54.
33. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, et al. **C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesion of human coronary arteries.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1386-92.

34. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, et al. **Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques.** *Am J Pathol* 2001; 158: 1039-51.
35. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. **Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages.** *Circulation* 2001; 103: 1057-63. 348 *clinical Trials and their Interpretations.*
36. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, et al. **Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue.** *Circulation* 2003; 107: 671-4.
37. Blake GJ, Ridker PM. **C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes.** *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 37S-42S.
38. Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, et al. **Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case control study.** *Am J epidemiol* 1996; 144: 537-47.
39. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al. **Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men.** *N Engl J Med* 1997; 336:973-9.
40. Ridker PM, Rifai N, Rose L, et al. **Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events.** *N Engl J Med* 2002; 347: 1557-65.
41. Albert CM, Ma J, Rifai N, et al. **Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death.** *Circulation* 2002; 105: 2595-99.
42. Sakkinen P, Abbott RD, Curb JD, et al. **C-reactive protein and myocardial infarction.** *J Clin Epidemiol* 2002; 55: 445-51.
43. Curb JD, Abbott RD, Rodriguez BL, et al. **C-reactive protein and the future risk of thromboembolic stroke in healthy men.** *Circulation* 2003; 197: 2016-20.
44. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, et al. **Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events.** *N Engl J Med* 2001; 344: 1959-65.
45. Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, et al. **Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease : Prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study.** *JAMA* 2002; 288: 980-7.
46. Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, et al. **lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention study group.** *N Engl J Med* 2000; 343: 1148-55.
47. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al. **C-reactive protein and others markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women.** *N Engl J Med* 2000; 342: 836-43.
48. Roivainen M, Viik-Kajander M, Palosuo T, et al. **Infections, inflammation, and the risk of coronary heart disease.** *Circulation* 2000; 101: 252-7.
49. Lowe GD, Yarnell JW, Rumley A, et al. **C-reactive protein, fibrin D-dimer, and incident ischemic heart disease in the Speedwell: are inflammation and fibrin turnover linked in pathogenesis?.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 603-10.

50. Ridker PM. High-sensitivity **C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease.** *Circulation* 2001; 103: 1813-18.
51. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. **Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, Fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease.** *JAMA* 2001; 285: 2481-85.
52. Rost NS, Wolf PA, Kase CS, et al. **Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack : the Frammingham study.** *Stroke* 2001; 32: 2575-79.
53. Folsom AR, Aleksic N, Catellier D, et al. **C-reactive protein and incident coronary heart disease in the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study.** *Am Heart J* 2002; 144: 233-8.
54. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, et al. **Prediction of coronary heart disease using risk factors categories.** *Circulation* 1998; 97: 1837-47.
55. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. **C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction.** *Circulation* 1998; 97: 2007-11.
56. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults: **Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III).** *JAMA* 2001; 285: 2486-97.
57. Koenig W, Khuseyinova N, Hoffmann M, et al. **CD14 C(-260)T Polymorphism, plasma levels of soluble endotoxin receptor CD14, their association with chronic infections and risk of stable coronary artery disease.** *JACC* 2002; 40: 34-42.
58. Bernardo E, Angiolillo DJ, Ramírez C, Cavalli U, et al. **Influence of the CD14 C-260T promoter polymorphism on C-reactive protein levels in patients with coronary artery disease.** *Am J Cardiol* 2006; 98: 1182-4.
59. Campos J, González-Quintela A, Quinteiro C, et al. **The -159C/T polymorphism in the promoter region of the CD14 gene is associated with advanced liver disease and higher serum levels of acute-phase proteins in heavy drinkers.** *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 1206-13.
60. Morange PE, Saut N, Alessi MC, Frere C, et al. **Interaction between the C-260T polymorphism of the CD14 gene and the plasma IL-6 concentration on the risk of myocardial infarction: The HIFMECH study.** *Atherosclerosis* 2005; 179: 317-23.
61. Hubacek JA, Stavek P, Pit'ha J, et al. **CD14 C-159T polymorphism and levels of C-reactive protein.** *Cas Lek Cesk* 2003; 142: 174-6.
62. Uribe M, Valdovinos MA. **PCR en diferentes poblaciones mexicanas sanas.** *Rev Mex Nutr* 2004; 156: 1250-54.
63. Kemeckezi L, Roberts I, Sanborns R. **Genetic Variability and coronary risk.** *Atherosclerosis* 2006, 198: 234-48.