

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**POLIMORFISMOS +1444 C/T Y +1846 G/A DEL GEN DE LA
PROTEÍNA C REACTIVA Y SU ASOCIACIÓN CON LOS NIVELES DE
SU PROTEÍNA EN PERSONAS CON OBESIDAD**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A:

AMÉRICA MARTÍNEZ CALLEJA

DIRECTORA DE TESIS: MC. EUGENIA FLORES ALFARO

CODIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE FRANCISCO MUÑOZ VALLE

CHILPANCINGO, GRO., AGOSTO DE 2009.

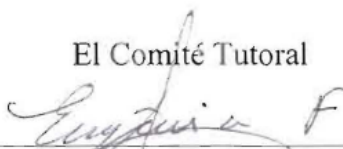



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS


En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 10 días del mes de julio de dos mil nueve, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “Polimorfismos +1444 C/T y +1846 G/A del gen de la proteína C Reactiva y su asociación con los niveles de su proteína en personas con obesidad”, presentada por la alumna América Martínez Calleja, para obtener el Grado de **Maestría en Ciencias Biomédicas**. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

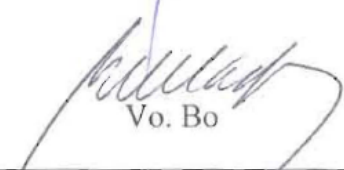

M en C. Eugenia Flores Alfaro
Dirección de tesis



Dr. José Francisco Muñoz Valle
Codirección de tesis

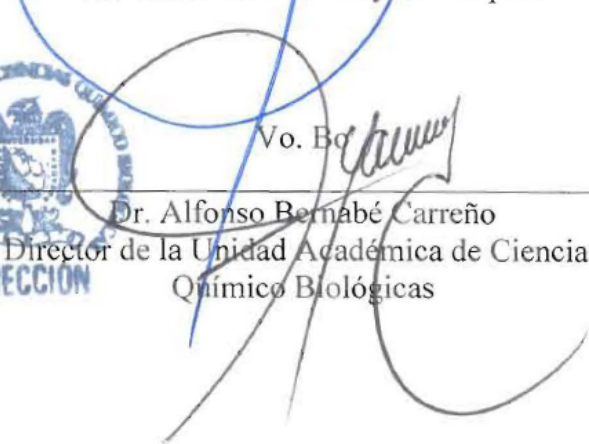

Dra. Amalia Vences Velázquez



Dra. Isela Parra Rojas


Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez


Vo. Bo


Dra. Berenice Illades Aguiar
Coordinadora de la Maestría en Ciencias
Biomédicas


Vo. Bo


Dr. Alfonso Bernabé Carreño
Director de la Unidad Académica de Ciencias
Químico Biológicas

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Enfermedades Crónicas Degenerativas de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, con beca de CONACYT para estudios de maestría. Bajo la dirección de: **MC. Eugenia Flores Alfaro**, asesorado por: **Dra. Isela Parra Rojas, Dra. Amalia Vences Velázquez, Dr. José Francisco Muñoz Valle, Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez.**

Agradesimientos

A Dios:

Por su gran amor hacia mí.

A mi comité tutorial:

Gracias por sus observaciones, sugerencias, aportaciones y el tiempo dedicado en la realización de este trabajo.

A mis padres:

*Valentina calleja Gálvez y
Guillermo Martínez Santiago
Que día a día me demuestran su amor, cariño y apoyo para seguir adelante, gracias por la confianza que me han brindado siempre.*

A mis hermanos:

*“Leo, Jose, Ofé, Aris y Huberth”
Por su comprensión y sus palabras que me impulsan a continuar y a lograr mis metas.*

Juan Manuel G.A por su cariño y por acompañarme en todos los momentos importantes. A Luz E, Aralia B. y a todo el equipo del laboratorio por su amistad, compañerismo al compartir inquietudes, éxitos, y fracasos durante la realización de los experimentos.

A mis amigos:

Por enseñarme el valor de la amistad, la confianza, el apoyo y por los muchos gratos momentos que hemos vivido.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIAL Y MÉTODOS	6
RESULTADOS	11
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	19
REFERENCIAS	25

RESUMEN

Varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del gen de la proteína C reactiva (CRP) se han asociado con el incremento en la concentración sérica de su proteína, algunos de ellos se han correlacionado con enfermedad cardiovascular. En este estudio se determinó la asociación entre los genotipos-haplotipos de los SNPs +1444 C/T y +1846 G/A con la concentración sérica de la CRP y otros factores de riesgo cardiovascular. Se estudiaron 100 personas sanas y 101 con obesidad del estado de Guerrero, de ambos sexos, de 30 años o más, normotensos, sin enfermedades agudas o crónicas; se analizaron características sociodemográficas, somatométricas, diversos parámetros bioquímicos de laboratorio clínico, en cada participante y la identificación de los polimorfismos +1444 C/T y +1846 G/A, se realizó por PCR-RFLP. La edad promedio de los participantes fue de 40 años, el 77.6% fueron mujeres. Los genotipos de mayor frecuencia fueron el CT para el SNP +1444 y el GA del +1846, con 61% y 53%, respectivamente. Los factores que tuvieron un efecto sobre el incremento de la concentración sanguínea de la CRP fueron obesidad, adiposidad abdominal y cuenta leucocitaria ($p < 0.001$); así como el genotipo GA del SNP +1846 ($p = 0.043$), por otra parte, los genotipos TT y CT del SNP +1444 se asociaron con la presencia de obesidad (OR=6.6 y OR=5.4, respectivamente). Se encontró que en los individuos portadores del haplotipo 1 (T-G) tienen 9.1 veces más riesgo de presentar obesidad en comparación de los portadores del haplotipo 2 (C-A) que muestran menor posibilidad de tener obesidad. Concluimos que ambos polimorfismos cumplen un papel importante en el desarrollo de enfermedad cardiovascular al relacionarse con la obesidad y con el incremento en la concentración sérica de la CRP.

Palabras claves: CRP, SNP, obesidad, factores de riesgo de enfermedad cardiovascular.

ABSTRACT

Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the C reactive protein gene (*CRP*) have been associated with increase serum concentration of their protein, some of them have been correlated with cardiovascular disease. In this study we determined the association between genotypes-haplotypes of the SNPs +1444 C/T and +1846 G/A with the serum concentration of CRP and other cardiovascular risk factors. Were studied 100 healthy subjects and 101 with obesity from Guerrero state, of both genders, 30 years or older, normotensive, without acute or chronic diseases, were analyzed the demographic, somatometric characteristics and various biochemical parameters of clinical laboratory of each participant and the identification of the polymorphisms +1444 C/T and +1846 G/A, was performed by PCR-RFLP. The average age of participants was 40 years, 77.6% were women. The genotypes of greater frequency were the CT for SNP +1444 and GA of the +1846, with 61% and 53%, respectively. The factors that associated with on increase of the CRP blood concentration were obesity, abdominal adiposity and leukocyte count ($p < 0.001$); as well as the GA genotype of SNP +1846 ($p = 0.043$). On the other hand, TT and TC genotypes of SNP +1444 was associated with the presence of obesity (OR=6.6 and OR=5.4, respectively). In addition, the individuals carrying of haplotype 1(T-G) have 9.1 times more risk to present obesity in comparison with the carrying of haplotype 2(C-A) that show less possibility of having obesity. We conclude that both polymorphisms have an important role in the development of cardiovascular disease to relate with the obesity and with the increasing serum concentration of the CRP.

Key words: CRP, SNP, obesity, cardiovascular disease risk factor.

INTRODUCCIÓN

La proteína C reactiva (CRP), es una proteína de fase aguda que refleja el grado de inflamación, varios estudios han establecido su utilidad clínica como biomarcador en la predicción del riesgo de eventos cardiovasculares, además de tener un valor predictivo en la progresión de la diabetes mellitus tipo 2 (DT2) (Blake, 2003; Greenfield *et al.*, 2004; Ridker, 2004; MUSAAD, 2007). El incremento de la concentración sanguínea de esta proteína se ha correlacionado con la presencia de obesidad y con la presencia de polimorfismos en el gen de la *CRP* (Carlson *et al.*, 2005; Chen, 2005; Szalai *et al.*, 2005; Day, 2007). La CRP pertenece a la familia de las proteínas pentraxinicas y presenta una estructura pentamérica cíclica con peso molecular de 110 kDa y una vida media de 19 h (Hirschfield, 2003; Pepys, 2003; Ramírez *et al.*, 2007).

Los niveles séricos de la CRP en personas sanas es de 1.0 mg/L y puede incrementarse hasta 1000 veces en infecciones, y en infarto al miocardio se eleva de 2 a 100 mg/L en 48 h (Black, 2004); recientemente el Centro de Control de Enfermedades y la Asociación Americana del Corazón, han propuesto tres categorías para evaluar el riesgo cardiovascular en función de los niveles sanguíneos de la CRP: < 1 mg/L, de 1 a 3 mg/L y > 3 mg/L, que representan riesgo de daño cardiovascular bajo, moderado y alto, respectivamente (Miller *et al.*, 2005).

La CRP circulante procede fundamentalmente del hígado y la producción extra hepática se genera principalmente en tejido adiposo, células del músculo liso, monocitos, linfocitos T y macrófagos principalmente (Verma *et al.*, 2003; Lau, 2005; Desruisseaux, 2007).

En obesidad, hay un incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) a partir de un daño vascular constante y progresivo, caracterizado por un proceso inflamatorio crónico de bajo grado (Del Rio, 2003; Malnick, 2006; Bowie, 2007), debido a que, los adipocitos producen la tercera parte de la interleucina (IL-6) en

circulación, que a su vez estimula la producción de la CRP en células hepáticas, por consiguiente, los individuos con sobrepeso y obesidad tienden a tener niveles elevados de la CRP (Lau, 2005; Cachofeiro, 2006), esto favorece el desarrollo del proceso inflamatorio y aterosclerótico al aumentar la expresión de moléculas de adhesión intercelular y vascular (ICAM-1, VCAM-1), E selectina, y la expresión de proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) que facilita el reclutamiento de monocitos y linfocitos, favoreciendo la formación de un medio proinflamatorio en la subíntima endotelial, aunado a que la CRP participa en la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) implicado en la transcripción de un importante número de genes funcionales en el proceso inflamatorio. Además, se ha demostrado que la CRP participa en la modulación de la angiogénesis e inestabilidad de las placas ateroscleróticas, al activar la vía de señalización celular de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3-K) y cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1/2), por consiguiente, un incremento en la expresión de genes claves para este proceso, como el factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A), entre otras (Bello *et al.*, 2008; Turu *et al.*, 2008).

La CRP también estimula la liberación de citocinas por parte de los macrófagos, favoreciendo la progresión del proceso inflamatorio (Pasceri, 2000; Labarrere, 2004; Berg, 2005; Fantuzzi, 2005), además de la participación de la CRP en la disminución del óxido nítrico y por tanto, de su actividad vasodilatadora, al inhibir la expresión de la guanosina-trifosfato ciclohidrolasa 1 (GTPCH1), enzima que interviene en la formación de tetrahidrobiopterín (BH₄), que actúa como cofactor para la actividad de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), la disminución de BH₄ da lugar al incremento de especies reactivas de oxígeno, por la activación de la dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato (NADPH) por parte de la endotelina-1, con la consiguiente disfunción endotelial y al desacoplamiento de la eNOS (Jialal, 2009). Por otra parte, se ha descrito que la CRP disminuye la expresión y vida media del mRNA de la eNOS (Torzewski *et al.*, 2000; Weisberg, 2003; Paffen, 2006) por la reducción en la producción endotelial de la guanosina monofosfato (GMP), que promueve la síntesis y liberación del ON (Verma, 2002).

En el proceso aterosclerótico, los depósitos de grasa son producto inicial de la acumulación de células espumosas (macrófagos), monocitos y linfocitos T, la transformación de los macrófagos tisulares en células espumosas se produce por la captación de LDL oxidada a través de los receptores scavenger (Torzewski *et al.*, 2000; Weisberg, 2003). A medida que progresa la lesión, se produce un aumento de moléculas quimioatrayentes, y la proliferación y migración de células musculares lisas, debido a la liberación de factores de crecimiento por las células inflamatorias acumuladas en la pared endotelial (Verma, 2005). Por otra parte, debido a la producción de metaloproteinasas, por los macrófagos activados en las placas ateroscleróticas, conducen a la destrucción del tejido conectivo y del colágeno de la capa fibrosa protectora de la placa, volviéndola más frágil (Paffen, 2006), por tanto, la inflamación arterial facilita la rotura de la placa aterosclerótica, ocasionando hemorragias y la formación de trombos, siendo la causa principal en más del 70% de los infartos agudos del miocardio mortales y accidentes cerebrovasculares (INEGI, 2006; Vizmanos, 2006; Velázquez *et al.*, 2007).

El gen de la *CRP* está localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q21-23), con tamaño aproximado de 2301 pb, presenta 2 exones. El exón 1 codifica para un péptido señal de 18 aminoácidos (a.a) y el exón 2 a un péptido de 204 a.a, seguido por un codón de paro, separados por un solo intrón de 280 pb, con una región 5'UTR de 104 pb, y una región 3'UTR de 1.2 kb (Szalai, 2002; Morita, 2006; Hage, 2007).

Se ha demostrado que la producción de la CRP está regulada a nivel transcripcional por la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que puede ser potenciada por la participación de la IL-1 β (Cachofeiro, 2006). La IL-6 participa en la activación transcripcional de la CRP a través de la activación del transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3), e isoformas β/δ del factor de transcripción que se une a secuencias CCAAT (C/EBP). C/EBP activa la transcripción a través de dos elementos de respuesta localizados en la posición -52 y -219, STAT3 se une al elemento de activación-cis localizado en la posición -180. La IL-1 β por su parte, conduce a la localización nuclear de los homodímeros p50, los cuales se unen a

sitios no consensos NF- κ B, facilitando y estabilizando la unión de C/EBP β , induciendo un cambio conformacional en el DNA, para la expresión de la CRP (Molstad, 2000; Choi, 2007; Nishikawa *et al.*, 2008; Young, 2008).

En el gen de la *CRP* humano se han identificado 40 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que se asocian con la variación en los niveles de esta proteína o su asociación con ECV. En la región 3'UTR los SNPs que principalmente se han asociado con el incremento en la concentración sérica de la CRP son el +1444 C/T (rs1130864), el +1846 G/A (rs1205) y el +219 (rs3093066) (Carlson *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2006; Crawford *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Kivima *et al.*, 2007).

El SPN +1444 C/T afecta el sitio de corte del transcrito en el extremo 3'UTR al estar localizado cerca de los elementos de reconocimiento de corte (secuencias ricas en AAUAA y elementos ricos en U o GU), en presencia del alelo C la señal de corte es menos eficiente y el cambio del alelo T hay incremento del reconocimiento del sitio de corte, de esta manera, sugerimos una mayor interacción del factor estimulador del corte (CstF) y al factor específico del corte y de poliadenilación (CPSF), incrementando el procesamiento del transcrito, por tanto, el aumento del mRNA y de la síntesis de la CRP.

El efecto biológico del SNP +1444 se refleja en el estudio realizado, en integrantes sanos de la armada de Inglaterra y en pacientes con cirugía de bypass de la misma nacionalidad (Brull *et al.*, 2003) donde, los niveles elevados de la CRP se encontró en individuos homocigotos portadores del alelo T en comparación de los portadores del alelo C, describen para el grupo de los sanos, una mayor frecuencia del genotipo CC (53.7%), seguido del CT (40.5%) y TT (5.7%), los autores reportan que el comportamiento de frecuencias genotípicas fueron similares en las dos poblaciones de estudio. Resultados semejantes (Brull *et al.*, 2003), fueron reportados en una población aparentemente sana en Estados Unidos de América (EUA) (Miller *et al.*, 2005), donde la concentración elevada de la CRP se presentó en los portadores del alelo T a diferencia de los portadores del alelo C. Por otra parte, en el estudio

realizado en personas sanas del estado de Guerrero (Baños y Bello, 2007) se encontró una frecuencia de 47.6% de individuos portadores del genotipo heterocigoto CT, reportando valores promedio de la CRP de 0.32 mg/L, 0.4 mg/L y 0.75 mg/L para los genotipos CC, CT y TT, respectivamente, ($p=0.08$).

El SNP +1846 G/A contribuye a la estabilidad del mRNA de la CRP al estar localizado dentro de la secuencia señal de poliadenilación (Russell *et al.*, 2004); denotando de esta manera el papel biológico que desempeña este SNP, en el estudio realizado en dos poblaciones aparentemente sanas en EUA (Miller *et al.*, 2005), donde se reportan valores promedio de la CRP de 1.68, 1.34 y 1.35 mg/L para los genotipos GG, GA y AA del SNP +1846 G/A ($p<0.001$). Reportando frecuencias genotípicas de 47% para el genotipo GA, el 42% para GG y para el AA del 11%, el comportamiento de las frecuencias genotípicas y la distribución de los valores de la CRP fueron similares en ambas poblaciones. Por otro lado, se reportan resultados similares en el estudio del corazón, realizada en personas aparentemente sanas en Framingham, EUA (Kathiresan *et al.*, 2006).

En México no se han reportado investigaciones que indiquen la asociación de estos SNPs del gen de la *CRP* con los niveles séricos de esta proteína y su relación con el riesgo cardiovascular, en personas con obesidad. Por tanto, es importante que se realicen estudios que determinen la susceptibilidad genética a estas patologías, brindando información que puedan ayudar a desarrollar en función del riesgo del individuo, tratamientos específicos en la prevención temprana de la ECV, en ese contexto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la asociación entre los genotipos/haplotipos de los polimorfismos +1444 C/T y +1846 G/A del gen de la *CRP* con los niveles sanguíneos de su proteína y otros factores de riesgo cardiovascular en personas con obesidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de casos y controles, con 100 muestras de DNA de personas sanas y 101 de personas con obesidad captadas entre julio de 2003 a junio de 2005, en las clínicas hospital del ISSSTE y del Centro de Salud Guillermo Soberón Acevedo de Chilpancingo, Gro.

Se incluyeron muestras de DNA de personas originarias del estado de Guerrero no relacionadas genéticamente, de ambos sexos, de 30 o más años de edad, con IMC ≥ 30 kg/m² para los casos y un IMC ≤ 25 kg/m² para los controles, normotensos (presión arterial menor de 130/85 mmHg) con mediciones de la proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP), glucosa, colesterol, triglicéridos, plaquetas, leucocitos, antecedentes familiares de diabetes (AFD), antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular (AFECV), escolaridad, y ejercicio. En el estudio se excluyeron personas con hábitos de tabaquismo, alcoholismo, o con algún tipo de enfermedad aguda o crónica (ECV, artritis, fiebre, gripe e infecciones) y mujeres embarazadas.

Mediciones somatométricas y bioquímicas.

Del cuestionario, se obtuvieron datos generales de cada participante, como actividad física, escolaridad, AFD y AFECV, entre otros. La presión sanguínea se midió con monitor automático HEM-712C; rango de 0 a 299 mmHg, el peso, la talla y la circunferencia de cintura se midieron con técnicas estándar. La toma de muestra sanguínea se realizó por venopunción con ayuno previo de 12 h; en el sistema hematológico ADVIA-60 se realizó la cuenta de plaquetas y leucocitos, se determinaron los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos por métodos enzimáticos convencionales, utilizando ensayos comerciales (Bayer, USA).

Para la determinación de la hsCRP se almacenaron alícuotas de suero a -20 °C y posteriormente se midieron por el método de inmunonefelometría (Dade Behring, Germany), utilizando anticuerpos monoclonales específicos para la detección de la CRP, usando el sistema automatizado con límite de detección de 0.175 mg/L.

El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética e Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. Las personas elegibles que aceptaron participar en el estudio lo hicieron mediante consentimiento informado, en todas sus etapas el proyecto se apegó a los lineamientos de la Asociación Médica Mundial, plasmados en la Declaración de Helsinki.

Determinación de los polimorfismos +1444 C/T y +1846 G/A del gen de la *CRP*.

El DNA genómico fue extraído de leucocitos de sangre periférica por el método de Miller (Miller, 1988), la pureza y concentración del DNA se determinó por fotometría (BioPhotometer Eppendorf, Germany).

SNP +1444 C/T. El DNA genómico se amplificó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando el iniciador sentido: 5'-AGCTCGTTAACTATGCTGGGGCA-3' y el iniciador antisentido: 5'-CTTCTCAGCTCTTGCCTTATGAGT-3' (Brull *et al.*, 2003), se empleó para cada reacción: 2.5 µL de buffer 1X; 2.0 µL de MgCl₂ 3.0 mM; 1.5 µL de DNTPs 2.0 mM; 2 µL de cada uno los iniciadores 0.2 mM; 3 µL de DNA 100 ng; 0.2 µL de *Taq* DNA recombinante (Invitrogen™, Brasil) 2U, con un volumen final de reacción de 23 µL. La amplificación se realizó en el termociclador Eppendorf (Mastercycler®, Germany) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min; seguida por 30 ciclos: desnaturalización a 95 °C por 15 s, alineamiento a 55 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 30 s y una extensión final de 72 °C durante 1 min.

Los productos de PCR (181 pb) se corrieron en geles de agarosa al 2% con amortiguador Tris Borato EDTA (TBE 1X) durante 35 min a 95 voltios, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transluminador de luz UV (Doc 2000T^M Bio Rad, USA). El tamaño de los fragmentos fue estimado con un marcador de peso molecular de 50 pb (Figura 1A).

Los genotipos se determinaron mediante la técnica de polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción (RFLP), sometiendo los productos de PCR a digestión con la enzima de restricción *HpyCH4III* (New England BioLabs, USA), que reconoce la secuencia ACCGT, haciendo un corte para el producto de PCR de 181 pb en presencia del alelo C, obteniendo dos fragmentos de 156 pb y 25 pb correspondientes al genotipo homocigoto CC, de 181,156 y 25 pb para el genotipo heterocigoto CT, para los portadores del genotipo homocigoto TT no hay corte, se observa únicamente un fragmento de 181 pb, estos fragmentos fueron estimados con un marcador de peso molecular de 50 pb, utilizando para cada reacción de digestión: 2.0 µL de Buffer 4 1X; 2.7 µL H₂O desionizada estéril; 0.3 µL de la enzima *HpyCH4III*; 5.0 µL DNA (producto de PCR) con un volumen final de reacción de 10 µL. La mezcla de reacción se incubó por 2:30 h a 37 °C; las muestras digeridas fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa al 4% con amortiguador TBE 1X durante 45 min a 85 voltios, teñido con bromuro de etidio para su visualización en el transluminador de luz UV (Doc 2000T^M Bio Rad, USA) (Figura 1B).

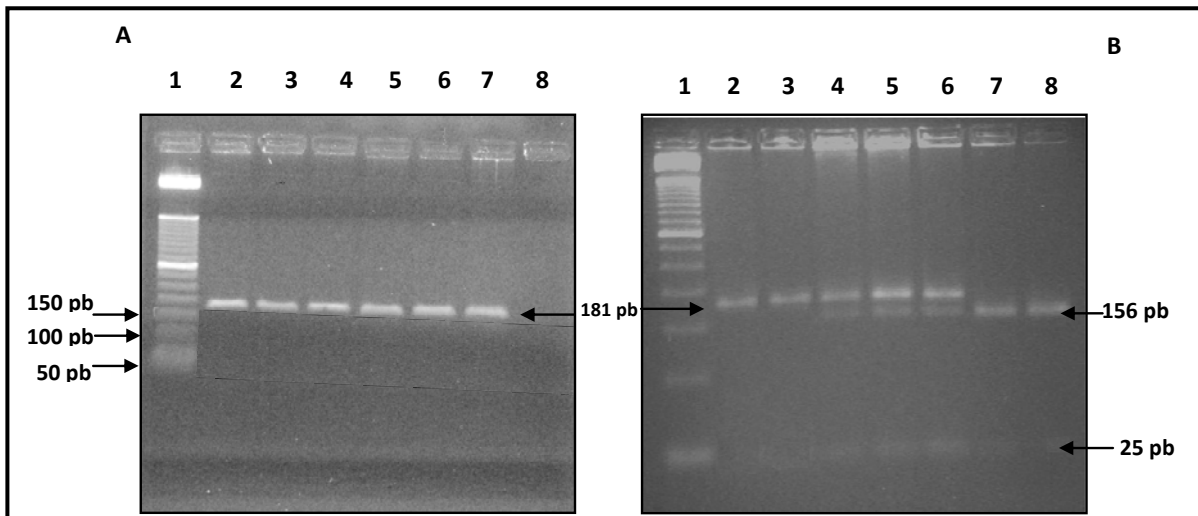


Figura 1. (A) Producto amplificado de 181 pb para la genotipificación del SNP +1444 C/T del gen de la *CRP*. Carril 1: marcador de peso molecular (PM) de 50 pb, carril 2: control positivo, carril 3 a 7 muestras amplificadas con producto de PCR de 181 pb, carril 8: control negativo. **(B)** Genotipos del SNP +1444 C/T del gen de la *CRP*, obtenidos al someter los productos de PCR a digestión con la enzima de restricción *HpyCH4III*. Carril 1: marcador de PM de 50 pb, carril 2 y 3: genotipo TT, Carril 4 a 6: genotipo CT, carril 7 y 8: genotipo CC.

SPN +1846 G/A. El DNA se amplificó con la técnica de PCR utilizando el iniciador sentido 5'-GGAGTGAGACATCTTCTTG-3' y el iniciador antisentido 5'-CTTATAGACCTGGGCAGT-3' (Russell *et al.*, 2004), empleando para cada reacción 2.5 µL de buffer 1X; 1.2 µL de MgCl₂ 2.5 mM; 2 µL de DNTPs 0.2 mM; 2 µL de cada uno de los iniciadores 0.2 mM; 1 µL de DNA 100 ng; 2 µL de *Taq* DNA recombinante (Invitrogen™, Brasil) 2U, con un volumen final de reacción de 24 µL. La amplificación se realizó en el termociclador Eppendorf (Mastercycler® Germany) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguida por 30 ciclos: desnaturalización a 94 °C por 20 s, alineamiento a 53 °C por 20 s, extensión a 72 °C por 20 s y una extensión final de 72 °C durante 5 min.

Los productos de PCR, se corrieron en geles de agarosa al 2% con amortiguador TBE 1X durante 35 min a 95 voltios, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transluminador de luz UV (Doc 2000T^M Bio Rad, USA) el tamaño de los fragmentos fue estimado con un marcador de peso molecular de 50 pb (Figura 2A).

Los productos de PCR (227 pb) fueron sometidos a digestión con la enzima de restricción *HpyCH4III* (Russell *et al.*, 2004) que reconoce la secuencia ACGGT, haciendo un corte en presencia del alelo G, obteniendo dos fragmentos de 130 pb y 97 pb correspondientes al genotipo homocigoto GG, de 227, 130 y 97 pb para el genotipo heterocigoto GA, en los portadores del genotipo homocigoto AA no hay corte, se observa únicamente un fragmento de 227 pb, los fragmentos fueron estimados con un marcador de peso molecular de 50 pb, empleando las siguientes cantidades de reactivos: 2.0 µL de Buffer 4 1X; 1 µL de enzima *HpyCH4III*; 10 µL de DNA (producto de PCR) con un volumen final de reacción de 13 µL; mezcla de reacción que posteriormente se incubó por 2:30 h a 37 °C. Las muestras digeridas fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa al 4% con amortiguador TBE 1X durante 45 min a 85 voltios, teñido con bromuro de etidio, para su visualización en el transluminador de luz UV (Doc 2000T^M Bio Rad, USA) (Figura 2B).

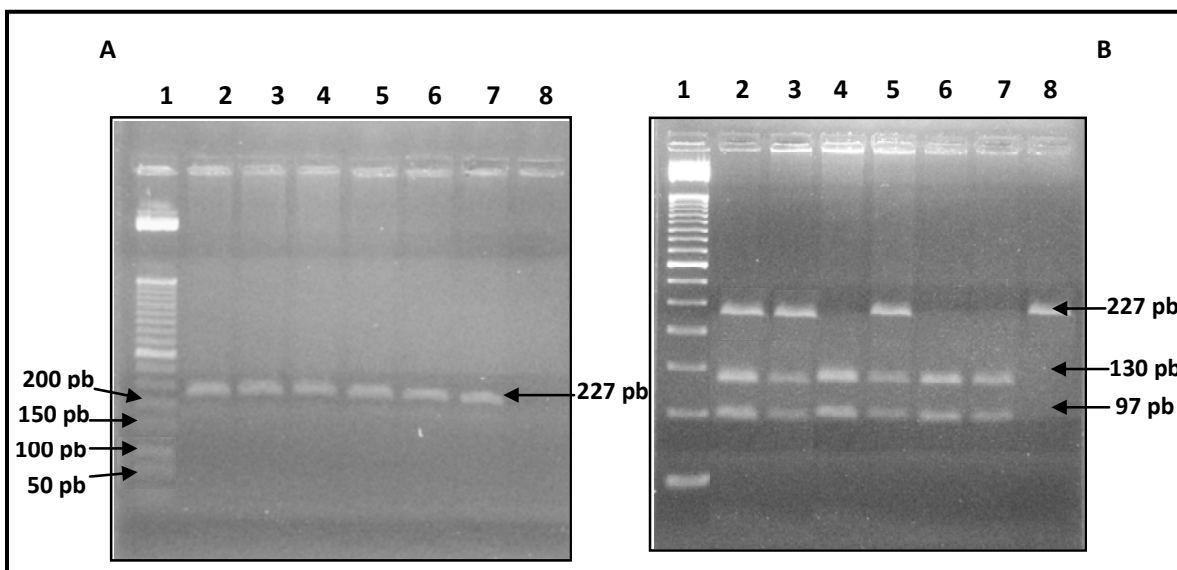


Figura 2. (A) Producto amplificado de 227 pb para la genotipificación del SNP +1846 G/A del gen de la *CRP*. Carril 1: marcador de PM de 50 pb, carril 2: control positivo, carril 3 a 7 muestras amplificadas con producto de PCR de 227 pb, carril 8: control negativo. **(B)** Genotipos del SNP +1846 G/A del gen de la *CRP*, obtenidos al someter los productos de PCR a digestión con la enzima de restricción *HpyCH4III*. Carril 1: marcador de PM de 50 pb, carril 2, 3 y 5: genotipo GA, Carril 4, 6 y 7: genotipo GG, carril 8: genotipo AA.

Análisis estadístico

Se obtuvo media y desviación estándar de las variables cuantitativas o medianas y rango intercuartil para las variables que presentaron sesgo o fueron variables de conteo y frecuencias de las variables categóricas. Para la comparación de frecuencias se utilizó la prueba de Xi cuadrada (χ^2), las pruebas de Kruskal Wallis o Mann Whitney para la comparación de medianas y para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza de un factor (ANOVA) o la prueba t de Student. Se evaluó la relación de la concentración sérica de la CRP con diversos factores de riesgo cardiovascular, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, previa transformación logarítmica de las variables que presentaron sesgo. La asociación entre los genotipos y haplotipos de los polimorfismos con los niveles sanguíneos de CRP, obesidad, adiposidad abdominal y otros factores de riesgo de ECV, se determinó por modelos múltiples de regresión lineal y logística. Reportando para todas las pruebas un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó en el software STATA v. 9.2.

RESULTADOS

Descripción de los grupos de estudio.

El valor medio de edad de los individuos estudiados fue de 40 años, el 77.6% fueron mujeres, todos fueron normotensos, sin embargo, el grupo de los obesos presentaron cifras superiores de presión arterial sistólica en comparación de los sanos (111.8 ± 15.6 mmHg vs 106.3 ± 12.9 mmHg; $p=0.007$) y de presión arterial diastólica (72.7 ± 8.8 mmHg vs 69.5 ± 8.5 mmHg; $p=0.009$), por otra parte, en este mismo grupo se presentaron valores elevados de IMC, circunferencia de cintura, glucosa, leucocitos, hsCRP, así como una menor escolaridad (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características clínicas y demográficas de los grupos de estudio.

Característica	Total n = 201	Sanos n = 100	Obesos n = 101	Valor p
Sexo				
Femenino	156 (77.6)	75 (75)	81 (80.2)	0.377 ^a
Masculino	45 (22.4)	25 (25)	20 (19.8)	
Edad (años)	40 (35-48)	40 (32-48)	41 (37-48)	0.233 ^b
IMC (kg/m²)	29.6 (23.6-33.1)	23.6 (22.4-24.6)	33.1 (30.8-35.1)	<0.001^b
Circunferencia de cintura (cm)	92 (82-103)	82.5 (76-88.5)	103 (97-107)	<0.001^b
PAS (mmHg)	109 \pm 14.5	106.3 \pm 12.9	111.8 \pm 15.6	0.007^c
PAD (mmHg)	71.1 \pm 8.8	69.5 \pm 8.5	72.7 \pm 8.8	0.009^c
Escolaridad (años)	7 (3-9)	7 (5-9)	6 (3-8)	0.001^b
Ejercicio				
No	100 (49.8)	54 (54)	46 (45.5)	0.231 ^a
Si	101 (50.3)	46 (46)	55 (54.5)	
AFD				
No	99 (49.3)	50 (50)	49 (48.5)	0.833 ^a
Si	102 (50.7)	50(50)	52 (51.5)	
AFECV				
No	130 (64.7)	63 (63)	67 (66.3)	0.621 ^a
Si	71 (35.3)	37 (37)	34 (33.7)	
Glucosa (mg/dL)	87 (81-94)	84 (77.5-90)	89 (84-100)	<0.001^b
Colesterol (mg/dL)	189 (163-220)	191 (168-222)	182 (154-218)	0.272 ^b
Triglicéridos (mg/dL)	140 (97-193)	131 (90-188)	148 (101-194)	0.083 ^b
Plaquetas (1 x 10 ³ mm ³)	273 (231-312)	272 (226-309)	276 (235-327)	0.529 ^b
Leucocitos (1 x 10³ mm³)	6.2 \pm 1.4	5.9 \pm 1.3	6.5 \pm 1.4	0.004^c
hsCRP (mg/L)	2.3 (0.9-5.5)	1.2 (0.6-2.7)	4.2 (2.0-6.8)	<0.001^b

Los datos indican media \pm desviación estándar, mediana (percentil 25 y 75) o n (%).

^aPrueba de X²; ^bMann Whiney; ^ct de Studen; IMC: índice de masa corporal; PAS (D): presión arterial sistólica (diastólica); AFD y AFECV: antecedentes familiares de diabetes y enfermedad cardiovascular; hsCRP: proteína C reactiva de alta sensibilidad.

Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP +1444 C/T y +1846 G/A del gen de la *CRP*.

Los SNP +1444 C/T y +1846 G/A en el grupo control, se encontraron en equilibrio génico de Hardy Weinberg ($X^2=1.07$, $p=0.39$; $X^2=0.19$, $p=0.66$, respectivamente).

En el grupo de los obesos el genotipo CT del SNP +1444 C/T se encontró con mayor frecuencia con el 69%, TT con el 21% y CC con el 10%, a diferencia del grupo de los sanos donde el genotipo CT se presentó con el 52%, seguido de los genotipos CC con el 36% y TT del 12%, encontrándose diferencias significativas entre los grupos de estudio ($p<0.001$).

Para el SNP +1846 G/A el genotipo GA fue el más frecuente con el 54%, GG del 34% y AA con el 12%, en el grupo de los obesos y para el grupo de los sanos se encontró una frecuencia del 51% de los portadores del genotipo GA, GG con el 32% y del AA con el 17% sin embargo, estas diferencias no fueron significativas entre los grupos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo +1444 C/T y +1846 G/A del gen de la *CRP* en personas sanas y con obesidad.

SNP		Total n (%)	Sanos n (%)	Obesos n (%)	Valor p ^a
+1444 C/T	Genotipos				<0.001
	CC	46 (23)	36 (36)	10 (10)	
	CT	122 (61)	52 (52)	70 (69)	
	TT	33 (16)	12 (12)	21 (21)	
	Alelos				
	C	214(0.53)	124(0.62)	90(0.45)	
	T	188(0.47)	76(0.38)	112(0.55)	
+1846 G/A	Genotipos				0.59
	AA	29 (14)	17 (17)	12 (12)	
	GA	106 (53)	51 (51)	55 (54)	
	GG	66 (33)	32(32)	34 (34)	
	Alelos				
	G	238(0.59)	115(0.57)	123(0.61)	
	A	164(0.41)	85(0.43)	79(0.39)	

^aPrueba de X^2

Descripción de los grupos de estudio por genotipos.

Características de los grupos por genotipos del SNP +1444 C/T del gen de la CRP.

Se encontró incremento significativo en los valores medios de IMC, circunferencia de cintura, presión arterial sistólica y niveles de glucosa ($p=0.001$, 0.041 , 0.04 , 0.007) en los individuos portadores del genotipo TT del polimorfismo +1444 C/T. Al comparar los niveles de la hsCRP con los diferentes genotipos, se observó que tanto el genotipo TT y CT presentaron un valor superior de la mediana de 2.6 mg/L y de 1.9 mg/L para el genotipo CC, sin embargo, estos valores no fueron significativamente diferentes entre los genotipos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Descripción de los grupos por genotipos del SNP +1444 C/T del gen de la CRP.

Característica	CC n = 46	CT n = 122	TT n = 33	Valor p
Sexo				
Femenino	33 (71.7)	93 (76.2)	30 (90.9)	0.101 ^a
Masculino	13 (28.3)	29 (23.8)	3 (9.1)	
Edad (años)	41 (36-51)	42 (35-50)	39 (36-43)	0.146 ^d
IMC (kg/m²)	24 (22.8-24.9)	30 (24.4-33.3)	31 (23.5-34.9)	0.001^d
Circunferencia de cintura (cm)	85 (80-96)	94 (83-103)	101 (81-106)	0.041^d
PAS (mmHg)	107.7±13.9	111±14.8	104±13.2	0.04^e
PAD (mmHg)	69.8±8	72.2±9	69.2±8.6	0.110 ^e
AFD				
No	26 (56.5)	52 (42.6)	21 (63.6)	0.054 ^a
Si	20 (43.5)	70 (57.4)	12 (36.4)	
AFECV				
No	34 (73.9)	77 (63.1)	19 (57.6)	0.276 ^a
Si	12 (26.1)	45 (36.9)	14 (42.4)	
Glucosa (mg/dL)	82.5 (77-90)	87.1 (83-95)	89 (82-96)	0.007^d
Colesterol (mg/dL)	187.5 (164-220)	192 (163-222)	184 (163-215)	0.658 ^d
Triglicéridos (mg/dL)	141 (90-187)	143 (99-193)	128 (97-163)	0.194 ^d
Plaquetas (1 x 10 ³ mm ³)	270 (225-326)	272 (234-303)	96 (253-348)	0.085 ^d
Leucocitos (1 x 10 ³ mm ³)	5.8±1.4	6.3±1.4	6.6±1.3	0.073 ^e
hsCRP (mg/L)	1.9 (0.8-5.0)	2.6 (1.0-5.6)	2.6 (0.6-5.5)	0.269 ^d

Los datos indican media ± desviación estándar, mediana (percentil 25 y 75) o n (%).

^aPrueba de X², ^dPrueba de Kruskal-Wallis, ^eANOVA.

Características de los grupos por genotipos del SNP +1846 G/A del gen de la CRP.

En los individuos portadores del genotipo GG del polimorfismo +1846 G/A, se encontró un incremento de los valores medios de IMC, circunferencia de cintura, colesterol, plaquetas y leucocitos aunque estos valores no fueron significativamente diferentes entre los genotipos, excepto para las plaquetas ($p=0.019$), al comparar la concentración sanguínea de los niveles de la hsCRP con los diferentes genotipos, se observó que los genotipos GA y GG presentaron valores más altos de la mediana, de 2.8 mg/L y 2.2 mg/L, respectivamente, que el genotipo AA que mostró un valor de 1.6 mg/L, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Descripción de los grupos de estudio por genotipos del SNP +1846 G/A del gen de la CRP.

Característica	AA n = 29	GA n = 106	GG n = 66	Valor p
Sexo				
Femenino	21 (72.4)	83 (78.3)	52 (78.8)	0.766 ^a
Masculino	8 (27.6)	23 (21.7)	14 (21.2)	
Edad (años)	39 (35-43)	42 (35-49)	40 (36-47)	0.501 ^d
IMC (kg/m ²)	24.8 (24-30.3)	29.8 (24.-33)	30 (23-34.5)	0.427 ^d
Circunferencia de cintura (cm)	90 (82-95)	92 (83-102)	93 (80-104)	0.782 ^d
PAS (mmHg)	111.7±13.6	109.4±15.2	107.4±13.9	0.404 ^e
PAD (mmHg)	73.2±7.9	71.4±9.4	69.8±7.8	0.202 ^e
AFD				
No	15 (51.7)	55 (51.9)	29 (43.9)	0.574 ^a
Si	14 (48.3)	51 (48.1)	37 (56.1)	
AFECV				
No	21 (72.4)	69 (65.1)	40 (60.6)	0.536 ^a
Si	8 (27.6)	37 (34.9)	26 (39.4)	
Glucosa (mg/dL)	87 (82-93)	87 (81-94)	86 (80-95)	0.965 ^d
Colesterol (mg/dL)	177 (163-208)	196 (163-223)	185 (164-215)	0.292 ^d
Triglicéridos (mg/dL)	143 (123-190)	134.5 (92-187)	142.5 (100-195)	0.703 ^d
Plaquetas (1 x 10³ mm³)	246.5 (211-285)	286 (237-336)	269 (231-309)	0.019^d
Leucocitos (1 x 10 ³ mm ³)	6.1±1.5	6.2±1.4	6.3±1.3	0.729 ^e
hsCRP (mg/L)	1.6 (1.9-3.4)	2.8 (1.0-6.0)	2.2 (0.7-5.1)	0.115 ^d

Los datos indican media ± desviación estándar, mediana (percentil 25 y 75) o n (%).

^aPrueba de X², ^dPrueba de Kruskal-Wallis, ^eANOVA.

Asociación de la concentración sérica de la CRP con diferentes factores de riesgo cardiovascular.

Los niveles séricos de la hsCRP se correlacionaron significativamente con el IMC, circunferencia de cintura, PAS, PAD y cuenta de leucocitos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Correlación de los niveles séricos de la CRP con los factores de riesgo cardiovascular.

Factor	r	P
Edad (años)	0.132	0.062
IMC (kg/m ²)	0.451	<0.001
Circunferencia de cintura (cm)	0.388	<0.001
PAS (mmHg)	0.214	0.002
PAD (mmHg)	0.267	<0.001
Glucosa (mg/dL)	0.123	0.071
Colesterol (mg/dL)	0.067	0.344
Triglicéridos (mg/dL)	0.123	0.083
Plaquetas (1 x 10 ³ mm ³)	0.104	0.205
Leucocitos (1 x 10 ³ mm ³)	0.368	<0.001

r. Coeficiente de correlación de Pearson

Efecto de los factores de riesgo cardiovascular sobre la concentración sanguínea de la CRP.

Al evaluar el efecto de los factores de riesgo cardiovascular sobre la concentración sérica de la hsCRP, se encontró que la obesidad, el genotipo GA del polimorfismo +1846 G/A, adiposidad abdominal y la cuenta de leucocitos tuvieron un efecto significativo en el incremento de los niveles sanguíneos de la CRP con coeficientes de regresión β de 2.9, 1.6, 2.5 y 0.9, respectivamente, ajustados por edad, sexo, escolaridad, ejercicio y AFECV (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de los factores de riesgo cardiovascular sobre la concentración sanguínea de la CRP.

Factor	Modelo ajustado por edad			Modelo múltiple ^c		
	β^a (IC95%)	Valor p	R ²	β^a (IC95%)	Valor p	R ²
Obesidad ^b	2.9 (2.0, 3.9)	<0.001	0.15	2.9 (1.9, 3.9)	<0.001	0.17
Polimorfismo +1444 C/T						
CT ^b	0.8 (-0.5, 2.1)	0.231	0.01	0.7 (-0.6, 2.1)	0.268	0.04
TT ^b	0.7 (-1.0, 2.5)	0.413		0.5 (-1.3, 2.3)	0.551	
Polimorfismo +1846 G/A						
GA ^b	1.7 (1.0, 3.2)	0.038	0.03	1.6 (0.05, 3.2)	0.043	0.05
GG ^b	1.0 (-0.7, 2.6)	0.245		0.9 (-0.8, 2.6)	0.281	
Adiposidad abdominal	2.5 (1.5, 3.5)	<0.001	0.12	2.5 (1.4, 3.6)	<0.001	0.12
Colesterol (mg/dL)	0.0 (-0.0, 0.01)	0.734	0.01	0.0 (-0.0, 0.02)	0.454	0.03
Leucocitos (10 ³ / μ L)	0.9 (0.5, 1.3)	<0.001	0.12	0.9 (0.5, 1.3)	<0.001	0.16

^a Coeficiente de regresión (Intervalo de confianza de 95%);

^b Categoría de referencia: Sanos, CC, AA, no adiposidad abdominal.

^c Ajustado por edad, sexo, escolaridad, ejercicio y AFECV.

Factores de riesgo cardiovascular y su asociación con obesidad.

Al estimar el riesgo relativo entre los diversos factores de riesgo cardiovascular con obesidad, se encontró asociación significativa con los genotipos CT y TT del polimorfismo +1444 (OR=5.4; IC_{95%}: 2.4-12.2; OR=6.6; IC_{95%}: 2.3-19.3, p<0.001, respectivamente) sin embargo, los genotipos GA y GG del polimorfismo +1846 G/A no mostraron asociación con obesidad (OR=1.6; IC_{95%}: 0.7-3.7; OR=1.5; IC_{95%}: 0.6-3.7, p>0.05). Otros factores de riesgo cardiovascular asociados con obesidad fueron adiposidad abdominal, PA sistólica, niveles séricos de la hsCRP y cuenta de leucocitos ajustados por edad, sexo, escolaridad, ejercicio y AFECV (Cuadro 7).

Cuadro 7. Factores de riesgo cardiovascular y su asociación con obesidad.

Factor	Sanos n = 100	Obesos n = 101	Modelo no ajustado		Modelo ajustado ^a	
			OR (IC _{95%})	Valor p	OR (IC _{95%})	Valor p
SNP +1444 C/T						
CC	36	10	1.0		1.0	
CT	52	70	4.8 (2.2 -10.6)	< 0.001	5.4 (2.4 – 12.2)	< 0.001
TT	12	21	6.3 (2.3 – 17.1)	<0.001	6.6 (2.3 – 19.3)	0.001
SNP +1846 G/A						
AA	17	12	1.0		1.0	
GA	51	55	1.5(0.7-3.5)	0.318	1.6(0.7-3.7)	0.298
GG	32	34	1.5(0.6-3.6)	0.364	1.5(0.6-3.7)	0.405
Adiposidad abdominal						
No	87	8	1.0		1.0	
Si	13	93	77.8 (30.8 -196.8)	< 0.001	114.2 (37 – 352)	< 0.001
PA_sistólica n (%)						
< 130 mmHg	96	82	1.0		1.0	
≥ 130 mmHg	4	19	5.6 (1.8 – 17)	0.003	6.7 (2 – 22.5)	0.002
Colesterol n (%)						
< 200 mg/dL	53	62	1.0		1.0	
≥ 200 mg/dL	47	39	0.7 (0.4 – 1.2)	0.230	0.8 (0.4 – 1.4)	0.416
Triglicéridos n (%)						
< 150 mg/dL	60	52	1.0		1.0	
≥ 150 mg/dL	40	49	1.4 (0.8 – 2.5)	0.225	1.5 (0.9 – 2.8)	0.149
CRP n (%)						
≤ 3 mg/L	76	37	1.0		1.0	
> 3 mg/L	24	64	5.5 (3 – 10.1)	< 0.001	5.4 (2.9 – 10)	< 0.001
Leucocitos (10³/μL)	5.8±1.3	6.5±1.4	1.4 (1.1 – 1.8)	0.006	1.4 (1.1 – 1.9)	0.010

^a Ajustado por edad, sexo, escolaridad, ejercicio y AFECV.

OR: odds ratio; IC: Intervalo de confianza, media ± desviación estándar.

Frecuencias haplotípicas y su asociación con obesidad y el riesgo cardiovascular.

El haplotipo 1 (T-G), fue el más frecuente en el grupo de personas con obesidad con el 42%, mientras que el haplotipo 2 (C-A) en el grupo de los sanos se encontró con el 37%. No se encontró asociación entre los niveles séricos de riesgo cardiovascular de la CRP (>3 mg/L) con ninguno de los haplotipos (p=0.259), datos no mostrados, sin embargo, se encontró que los individuos portadores del haplotipo 2 tienen una disminución en el riesgo de desarrollar obesidad (OR=0.11; IC_{95%}:0.02-0.51; p=0.006) comparado con los portadores del haplotipo 1 que tienen un riesgo de 9.1 (1/0.11) veces más de desarrollar obesidad (Cuadro 8).

Cuadro 8. Asociación de los haplotipos de los polimorfismos +1444 C/T y +1846 G/A del gen de la CRP con la presencia de obesidad.

Haplotipos	+1444 C/T	+1846 G/A	Frecuencia (%)			OR (IC95%)	p
			Total	Sanos	Obesos		
1	T	G	0.38	0.33	0.42	1.0	
2	C	A	0.32	0.37	0.26	0.11 (0.02-0.51)	0.006
3	C	G	0.21	0.24	0.18	0.55 (0.15-2.07)	0.38
4	T	A	0.08	0.04	0.12	4.0 (0.35-46.01)	0.27

Ajustado por hsCRP, edad, sexo, ejercicio, AFECV, AFD y adiposidad abdominal.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Se ha documentado que la obesidad altera la función metabólica y endocrina del tejido adiposo, que ocasiona un incremento en la liberación de ácidos grasos, hormonas, moléculas proinflamatorias y proteínas de fase aguda, principalmente la CRP, que contribuyen en las complicaciones asociadas a la ECV. Por otra parte, se ha descrito que diversos SNPs en el gen de la *CRP* se asocian con incremento o disminución en los niveles séricos de su proteína; en este estudio se trabajó con dos SNPs, que en otros estudios han mostrado asociación con los niveles séricos elevados de la CRP el +1444 C/T y +1846 G/A localizadas en la región 3'UTR del gen de la *CRP* (Wang *et al.*, 2006; Hage, 2007; Eklund *et al.*, 2008).

En esta investigación, se encontró que el genotipo predominante del SNP +1444 C/T fue el CT, encontrándose una frecuencia total del 61% en sanos y obesos, estos resultados son similares a los reportados, en el estudio realizado en el estado de Guerrero (Baños y Bello 2007), donde reportan una frecuencia del 47.3% para el genotipo CT, pero difieren de lo reportado, en el estudio realizado en personas sanas y en pacientes con cirugía de bypass en Inglaterra (Brull *et al.*, 2003), quienes encontraron en el grupo de los sanos una mayor frecuencia del genotipo CC (53.7%), seguido del CT (40.5%) y TT (5.7%), en pacientes con cirugía de bypass los autores reportan el 46% del genotipo CC, para el CT (42%) y del TT el (12%), frecuencias genotípicas similares fueron reportados en una población aparentemente sana en EUA (Miller *et al.*, 2005); ambas investigaciones reportan que el alelo T mostró asociación significativa con el incremento de los niveles séricos de la CRP.

La heterocigosidad que encontramos en la población de estudio para el SNP +1444 C/T, es explicado por la ascendencia ancestral de la población mexicana con amerindios, europeos y africanos, aunado a que en nuestro estado de Guerrero hay una gran diversidad de grupos étnicos como mixtecos, nahualt, tlapanecos, amusgos, entre otros, diferente a las poblaciones mencionadas (Sánchez, 2003).

Para el SNP +1846 G/A el genotipo predominante fue el GA con el 53% en ambos grupos de estudio, resultados similares a los reportados en la población aparentemente sana de EUA (Miller *et al.*, 2005), donde las frecuencias genotípicas reportadas para este polimorfismo fueron, para el GA de 47%, GG con el 42% y para el AA del 11%, reportando valores promedio de la CRP de 1.68, 1.34 y 1.35 mg/L para los genotipos GG, GA y AA, respectivamente, ($p < 0.001$). Por otra parte, en el estudio del corazón en Framingham, EUA (Kathiresan *et al.*, 2006), encontraron resultados similares a los descritos por Miller, donde el alelo G del SNP +1846 G/A muestra asociación con las concentraciones elevadas de la CRP ($p < 0.001$).

La similitud en la distribución de las frecuencias genotípicas encontradas en el presente estudio para el SNP +1846 G/A, con la población de Estados Unidos, se pueden explicar por la constante migración de diferentes grupos raciales, principalmente de mexicanos, españoles y asiáticos en este país (Campbell, 1996), aunque la mayoría de la población estadounidense tiene ascendencia ancestral caucásica, a través del tiempo, estos grupos raciales han influenciado de manera importante en la composición genética de la población estadounidense.

En nuestro estudio, tanto el alelo T como el G de ambos SNPs, se asociaron con la presencia de obesidad, aunque para este último no fue significativa esta asociación. No hay estudios que demuestren el papel fisiopatogénico y molecular del alelo T del SNP +1444 C/T con la obesidad, relación encontrada en el presente trabajo, sin embargo, se ha documentado que varios SNPs en el gen de la CRP incluyendo el +1444 C/T se asocian con la DT2 (zee *et al.*, 2008), se conoce que la obesidad conduce a alteraciones metabólicas que pueden llevar a resistencia a la insulina, por lo tanto, este gen se puede considerar candidato en la participación de esta alteración, para ello, es necesario la realización de más estudios que comprueben esta hipótesis.

Por otro lado, hay reportes que indican que el alelo T y G contribuyen al incremento de los niveles séricos de la CRP (Brull *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2005; Kathiresan *et al.*, 2006), en nuestro estudio esta relación, se encontró solo para el genotipo GA del SNP +1846. También, se encontró un valor medio mayor de la CRP (2.6 mg/dL) en los portadores del alelo T para el SNP +1444 C/T, lo que se puede atribuir a una mayor señal de corte del pre-mRNA, análogo al papel funcional atribuido a la variante F2 20210 G/A del gen del factor de la coagulación II (F2), localizada a 20 nucleótidos río abajo de la señal poli A y a 20 nucleótidos río arriba de la secuencia rica en U, sitio donde se da el corte del pre-mRNA, como se conoce, el número de uridinas afecta este mecanismo, ocasionando una variación de ganancia de función al incrementar el reconocimiento del sitio de corte (Gehring, 2001; Brull *et al.*, 2003).

Los valores incrementados en la concentración sérica de la CRP para los portadores del alelo G (2.2 mg/dL) del SNP +1846 G/A, puede deberse a que este SNP contribuye en la estabilidad del mRNA de la CRP, por su localización dentro de la secuencia señal de poliadenilación (Russell *et al.*, 2004), donde la secuencia señal de reconocimiento AUUUA implicado en la degradación del mRNA (Conne, 2000), es afectado por la presencia de la variante G (GUUUA) al ocasionar un menor reconocimiento para la degradación de esta molécula, en comparación de la variante A, prolongando de esta manera la vida media del mRNA de la CRP de 2.5 a 3.5 h (Brull *et al.*, 2003).

No encontramos incrementos significativos en los niveles de la CRP, en los portadores del alelo T y G, debido a la existencia de una gran diversidad genética en la población mexicana actual, además, hay estudios que demuestran que la relación entre obesidad y niveles de la CRP, pueden variar en ciertos grupos raciales y étnicos (Wee, 2008), lo que además explica que una población sea más susceptible a desarrollar una enfermedad cardiovascular (Rojas *et al.*, 2008).

Otros factores de riesgo cardiovascular que se asociaron con la presencia de obesidad, fueron adiposidad abdominal, PAS, leucocitos y hsCRP, resultados similares a los reportados en el estudio (Freeman *et al.*, 2002; Crawford *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2008). A la presencia de obesidad abdominal se le atribuye a una mayor actividad lipolítica, por consiguiente un incremento de secreción de adipocitocinas proinflamatorias como las citocinas IL-6, IL-1 y TNF α , principales inductores de la CRP, considerándose, a la obesidad abdominal un importante predictor de riesgo de ECV (Fontana, 2007).

Por otra parte, la asociación encontrada con los factores de riesgo cardiovascular como presión arterial y la cuenta total de leucocitos en presencia de la obesidad, son debido, a que en esta patología se hace de manifiesto el aumento del volumen vascular por la presencia de inflamación y por el incremento en los niveles de angiotensina II (AT II) y aldosterona, produciéndose mayor retención de agua y sodio, que aunado a la vasoconstricción que ejerce AT II, da lugar a la desregulación en la homeostasis de la presión arterial, además, la AT II participa en la inflamación vascular y en la expresión de moléculas de adhesión, favoreciendo el reclutamiento de leucocitos en el proceso aterosclerótico (Berg, 2005; Rahmouni, 2005; Rojas *et al.*, 2008); los niveles séricos elevados de la CRP en presencia de obesidad encontradas en este estudio, también son explicados por la inflamación subclínica crónica característico en este grupo de personas (Kahn *et al.*, 2006; Fontana, 2007).

La correlación positiva encontrada, entre la CRP con la presión arterial y con la cuenta total de leucocitos ($p < 0.001$), se puede deber al efecto patológico que desempeña la CRP en la disminución del óxido nítrico y por tanto, de su actividad vasodilatadora, con la consiguiente disfunción endotelial, explicando de esta forma la correlación encontrada con este factor de riesgo cardiovascular (Jialal, 2009; Pasceri, 2000).

La CRP al contribuir en el aumento de la actividad transcripcional de NF- κ B involucrado en la transcripción de numerosas moléculas proinflamatorias, y la participación de esta proteína en el incremento de la expresión de moléculas de adhesión y quimioatrayentes, entre otros, favorecen el reclutamiento y acumulación de leucocitos y LDL en la íntima del endotelio, promoviendo el proceso aterosclerótico, denotando, la importancia de la asociación entre la cuenta de leucocitos con la CRP (Berg, 2005; Fantuzzi, 2005).

Los portadores del genotipo GA del SNP +1846 G/A, la obesidad general, la adiposidad abdominal y la cuenta total de leucocitos, tuvieron un efecto significativo en el incremento de los niveles sanguíneos de la CRP ($p < 0.05$), demostrando así, una vez más el papel patológico de la obesidad, al contribuir con los niveles séricos elevados de la CRP, al daño vascular y el riesgo que representa, ser portadores de polimorfismos de riesgo de enfermedad cardiovascular.

La asociación encontrada entre obesidad y portadores del genotipo TT del SNP +1444, también se observa en el análisis de los haplotipos 1 (T-G) que muestran mayor riesgo de presentar obesidad a diferencia de los portadores del haplotipo 2 (C-A), donde hay protección ante el desarrollo de esta patología, esta interesante asociación sugiere que los alelos de estos SNPs pudieran estar segregando de manera conjunta, esta inferencia deberá ser confirmada con estudios de ligamiento genético, por otra parte, se ha documentado que en las poblaciones donde existe mezcla de individuos como la población mexicana, favorece el aumento de desequilibrio de ligamiento, por lo que podemos asumir, una mayor predisposición a ciertas patologías (Guardado, 2008), una vez más se pone de manifiesto que la obesidad tuvo un impacto diferencial sobre los niveles séricos de la CRP, hay estudios que demuestran que los niveles séricos de esta proteína y la predisposición a obesidad varían de acuerdo a la raza y sexo (Wee, 2008).

Con estos resultados, concluimos que ambos polimorfismos tienen un papel importante en el desarrollo de enfermedad cardiovascular, los portadores del genotipo GA del SNP +1846, al mostrar asociación significativa con las concentraciones séricas elevadas de la CRP y el genotipo TT del SNP +1444 por su asociación con la presencia de obesidad, que en si misma representa un factor de riesgo cardiovascular y posiblemente este SNP, confiere mayor riesgo a esta patología, esta relación y la protección encontrada ante el desarrollo de la obesidad en los portadores del haplotipo 2 (C-A), deberán ser demostradas en otros estudios, para hacer posible el uso del SNP +1444, como marcador genético de susceptibilidad a obesidad.

REFERENCIAS

- Baños, G., Bello, R. (2007). Polimorfismo +1444 C/T en la región 3'UTR del gen de la proteína C reactiva y su relación con los niveles sanguíneos de la proteína en personas sanas del región centro del Estado de Guerrero (tesis). Chilpancingo, Guerrero: Universidad Autónoma de Guerrero.
- Bello, G., Cailotto, F., Hanriot, D., Kolopp-Sarda, M. N., Latger-Cannard, V., Hess, K., *et al.* (2008). C-reactive protein (CRP) increases VEGF-A expression in monocytic cells via a PI3-kinase and ERK 1/2 signaling dependent pathway. *Arterioscler* 200: 286-293.
- Berg, A. H., Scherer, P. E. (2005). Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 96: 939-949.
- Black, S., Kushner, I., Samols, D. (2004). C-reactive protein. *J Biol Chem* 279: 48487-48490.
- Blake, G. J., Ridker, P. M. (2003). C-Reactive Protein and other inflammatory risk markers in agute coronary síndrome. *J Am Coll Cardiol* 41: S37-S42.
- Bowie, J., Juon, H. S., Cho, J., Rodríguez, E. M. (2007). Factors associated with overweight and obesity among Mexican Americans: results from the 2001 California health interview survey. *Prev Chronic Dis* 4: 1-14.
- Brull, D. J., Serrano, N., Zito, F., Jones, L., Montgomery, H. E., Rumley, A., *et al.* (2003). Human CRP gene polymorphism influences CRP levels implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 2063-2069.
- Cachofeiro, V., Miana, M., Martín, B., Heras, N., Lahera, V. (2006). Obesidad, inflamación y disfunción endotelial. *Rev Esp Obes* 4: 195-204.
- Carita, E. (2007). Gene polymorphisms affecting the production of C- reactive protein, clinical implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 10: 4-69.
- Carlson, C. S., Aldred, S. F., Lee, P. K., Tracy, R. P., Schwartz, S. M., Rieder, M., *et al.* (2005). Polymorphisms within the C-Reactive protein promoter region are associated with plasma CRP levels. *Am J Hum Genet* 77: 64-77.
- Casas, J. P., Shah, T., Cooper, J., Hawe, E., McMahon, A. D., Gaffney, D., *et al.* (2006). Insight into the nature of the CRP-coronary event association using Mendelian randomization. *Int J Epidemiol* 35: 922-931.
- Campbell, P.R. (1996). Population Projections for States by Age, Sex, Race, and Hispanic Origin: 1995 to 2025. [cited 05 de Julio 2009]; Available from: <http://www.census.gov/population/www/projections/ppl47.html>.
- Conne, B., Stutz, A., Vassalli, J. D. (2000). The 3'UTR untranslated region of messenger RNA: a molecular 'hotspot' for pathology?. *Nat Med* 6:637-641.
- Crawford, D. C., Christopher, L., Xiaoting, Q., Joshua, D. S., Shephard, C., Wong, M., *et al.* (2006). Genetic variation is associated with C-reactive protein levels in the third national health and nutrition examination survey. *Circulation* 114:2458-2465.
- Crawford, D. C., Yi, Q., Smith, J. D., Shephard, C., Wong, M., Witrak, L., *et al.* (2006). Allelic spectrum of the natural variation in CRP. *Am Hum Genet* 119:496-504.
- Chen, J., Zhao, J., Huang, J., Su, S., Qiang, B., Gu, D. (2005). -717A>G polymorphism of human C-reactive protein gene associated with coronary heart disease in ethnic han chinese: the beijing atherosclerosis study. *J Mol Med* 83: 72-78.
- Choi, Y. S., Hur, J., Jeong, S. (2007). β -Catenin binds to the downstream region and regulates the expression C-reactive protein gene. *Nucleic Acids Res* 35:1-9.
- Day, C. (2007). Metabolic syndrome, or what you Hill definitions and epidemiology. *Diab Vasc Dis Res* 4: 32-38.

- Del Rio, P. (2003). Obesidad y riesgo cardiovascular. *Rev Esp Nutr Comunit* 9: 61-98.
- Desruisseaux, M. S., Nagajyothi-Trujillo M. E., Tanowitz, H. B., Scherer, P. E. (2007). Adipocyte, adipose tissue, and infectious disease. *Infect Immun* 75: 1066-1078.
- Eklund, C., Kivimäki, M., Islam, S., Juonala, M., Kähönen, M., Marniemi, J., *et al.* (2008). C-reactive protein genetics is associated with carotid artery compliance in men in the cardiovascular risk in young finns study. *Arterioscler* 196: 841-848.
- Fantuzzi, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115: 911-919.
- Flores, E., Parra, I., Salgado, A. B., Chávez, J. P., Salazar, E. (2008). Cardiovascular risk evaluated by C-reactive protein levels in diabetic and obese Mexican subjects. *Circulation* 72: 1170-1174.
- Fontana, L., Eagon, J., Trujillo, M. E., Scherer, P. E., Klein, S. (2007). Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56: 1010–1013.
- Freeman, D., Norrie, J., Caslake, M. J., Gaw, A., Ford, I., Lowe G. D., *et al.* (2002). C-reactive protein in an independent predictor of risk for the development of diabetes in the west of scotland coronary prevention study. *Diabetes* 51: 1596-1600.
- Guardado, M., Queipo, G., Meraz, Marco., Berumen, J. (2008). Diversidad genética en la población mexicana: Utilización de marcadores de ADN. *Rev Med Hosp Gen Mex* 71(3): 162-174
- Gehring, N., Yilik, G. N., Hundsdoerfer, P., Vetter, B., Hentze, M. W., Kulozik, A. E. (2001). Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet* 28: 382-392.
- Greenfield, J. R., Samaras, K., Jenkins, A. B., Kelly, P. J., Spector, T. D., Gallimore, J. R., *et al.* (2004). Obesity Is an Important Determinant of Baseline Serum C-Reactive Protein Concentration in Monozygotic Twins, Independent of Genetic Influences. *Circulation* 109: 3022-3028.
- Hage, F. G., Szalai, A. J. (2007). C-reactive protein gene polymorphisms, C-reactive protein blood levels, and cardiovascular disease risk. *J Am Coll Cardiol* 50: 1115-1122.
- Hirschfield, G., Pepys, M.B. (2003). C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *QJM* 96: 793-807.
- INEGI (2006). Base datos 2006 México. Instituto nacional de estadística, geografía e informática (INEGI).
- Jialal, I., Verma, S., Devaraj, S. (2009). Inhibition of endothelial nitric oxide synthase by C-reactive protein: clinical relevance. *Clin Chem* 55: 206–208.
- Kahn, S. A., Zinman, B., Haffner, S. M., O'Neill, M. C., Kravitz, B. G., Yu, D., *et al.* (2006). Obesity is a Major Determinant of the Association of C-Reactive Protein Levels and the Metabolic Syndrome in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 55: 2357-2364.
- Kathiresan, S., Larson, M. G., Vasan, R. S., Guo, C. Y., Gona, P., Keaney, J. F. (2006). Contribution of clinical correlates and 13 C-reactive protein gene polymorphisms to interindividual variability in serum C-reactive protein level. *Circulation* 113: 1415-1423.
- Kivima, M., Lawlor, D. A., Smith, G. D., Eklund, C., Hurme, M., Lehtima, T., *et al.* (2007). Variants in the CRP gene as a measure of lifelong differences in average C-reactive protein levels (the cardiovascular risk in young finns study, 1980-2001). *Am J Epidemiol* 166: 760-764.
- Labarrere, C. A., Zaloga, G. P. (2004). C-reactive protein: from innocent bystander to pivotal mediator of atherosclerosis. *Am J Med* 117: 499-507.
- Lau, D. C., Dhillon, B., Yan, H., Szmítko, P. E., Verma, S. (2005). Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: 31-41.
- Malnick, S. D., Knobler, H. (2006). The medical complications of obesity. *QJM* 99: 565-579.

- Miller, D. T., Zee, R. Y., Danik, J. S., Koslowski, P., Chasman, D. I., Lazarus, R., *et al.* (2005). Association of common CRP gene variants with CRP levels cardiovascular events. *Am J Hum Genet* 69: 623-638.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Molstad, H., Agrawal, A., Zhang, D., Samols, D., Kushner, I. (2000). The rel family member P50 mediates cytokine-induced C-reactive protein expression by a novel mechanism. *J Immunol* 165: 4592-4597.
- Morita, A., Nakayama, T., Doba, N., Hinohara, S., Soma, M. (2006). Polymorphism of the C-reactive protein (CRP) gene is related to serum CRP level and arterial pulse wave velocity in healthy elderly Japanese. *Hypertens Res* 29: 323-331.
- Musaad, S., Haynes, E.N. (2007). Biomarkers of obesity and subsequent cardiovascular events. *Epidemiol Rev* 29: 98-114.
- Nishikawa, T., Hagihara, K., Serada, S., Isobe, T., Matsumura, A., Song, J., Tanaka, T., *et al.* (2008). Transcriptional complex formation of c-Fos, STAT3, and hepatocyte NF-1 is essential for cytokine-driven C-reactive protein gene expression. *J Immunol* 180: 3492-3501.
- Paffen, E., Maat, M. (2006). C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor?. *Cardiovasc Res* 71: 30-39.
- Pasceri, V., Willerson, J. T., Yeh, E. T. (2000). Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 102: 2165-2168.
- Pepys, M., Hirschfield, G. M. (2003). C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 111: 1805-1812.
- Rahmouni, K., Correia, M. L., Haynes, W. G., Mark, A. (2005). Obesity-Associated Hypertension: New Insights Into Mechanisms. *J Hypertens* 45: 9-14.
- Ramírez, C., Martínez, J., Lozano, J., Olvera, A., Higuera, L., García, E., *et al.* (2007). Proteína C reactiva de alta afinidad como marcador inflamatorio. *Rev Alergia Méx* 54: 7-13.
- Ridker, P. M., Brown, N. J., Vaughan, D. E., Harrison, D. G., Mehta, J. L. (2004). Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation* 109: IV-6-IV-19.
- Rojas, J., Bermúdez, V., Leal, E., Aparicio, D., Peña, G., Acosta, L., Finol, F., Urdaneta, A., *et al.* (2008). Origen étnico y enfermedad cardiovascular. *Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas* 27: 41-58.
- Russell, A. I., Cunninghame, D. S., Shepherd, C., Robertson, C. A., Meeks, J., *et al.* (2004). Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 13: 137-147.
- Sánchez, E. (2003). La certificación agraria en la montaña de Guerrero y las comunidades indígenas: problemas y perspectivas. *Revista mexicana de ciencias políticas y sociales* 1:291-309.
- Szalai, A. J., McCrory, M. A., Cooper, G. S., Wu, J., Kimberly, R. P. (2002). Association between baseline levels of C-reactive protein (CRP) and a dinucleotide repeat polymorphism in the intron of the CRP gene. *Genes Immun* 3: 14-19.
- Szalai, A. J., Wu, J., Lange, E. M., McCrory, M. A., Langefeld, C. D., Williams, A., *et al.* (2005). Single - nucleotide polymorphisms in the C-reactive protein (CRP) gene promoter that affect transcription factor binding, alter transcriptional activity, and associate with differences in baseline serum CRP level. *J Mol Med* 83: 440-447.
- Torzewski, M., Rist, C., Mortensen, R. F., Zwaka, T. P., Bienek, M., Waltenberger, J., *et al.* (2000). C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-

- dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 20: 2094-2099.
- Turu, M., Slevin, M., Matou, S., West, D., Rodríguez, C., Luque, A., *et al.* (2008). C-reactive protein exerts angiogenic effects on vascular endothelial cells and modulates associated signalling pathways and gene expression. *BMC Cell Biology* 9:1-14.
- Velázquez, O., Barinagarrementería, F. S., Rubio, A. F., Verdejo, J., Méndez, M. A., Violante, R., *et al.* (2007). Morbilidad y mortalidad de la enfermedad isquémica del corazón y cerebrovascular en México. *Arch Cardiol Méx* 77: 31-39.
- Verma, S., Badiwala, M. V., Weisel, R. D., Li, S. H., Wang, C. H., Fedak, P. W., *et al.* (2003). C-reactive protein activates the nuclear factor-kappa B signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126: 1886-1891.
- Verma, S., Szmitko, P. E., Ridker, P. M. (2005). C-reactive protein comes of age. *Nat Clin Practice Cardiol Med* 2: 29-36.
- Verma, S., Wang, C. H., Li, S. H., Dumont, A. S., Fedak, P. W., Badiwala, M. V., Dhillon, B. A. (2002). A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 106: 913-919.
- Vizmanos, B., Hunot, C., Capdevila, F. (2006). Alimentación y obesidad. *Inves salud* 8:79-85.
- Wang, Q., Hunt, S. C., Xu, Q., Chen, Y. E., Province, M. A., Eckfeldt, J. H., *et al.* (2006). Association study of CRP gene polymorphisms with serum CRP level and cardiovascular risk in the NHLBI Family Heart Study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1: 1-27.
- Wee, C. C., Mukamal, K. J., Huang, A., Davis, R. B., McCarthy, E. P., Mittleman, M. A. (2008). Obesity and C-reactive protein levels among white, black, and Hispanic US adults. *Obes* 16: 875–880.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808.
- Young, D. P., Kushner, I., Samols, D. (2008). Binding of C/EBP to the C-reactive protein (CRP) promoter in Hep3B cells is associated with transcription of CRP mRNA. *J Immunol* 181: 2420–2427.
- Zee, R., Germer, S., Thomas, A., Raji, A., Rhees, B., Ridker, M. P., Lindpaintner, K., *et al.* (2008). C-reactive protein gene variation and type 2 diabetes mellitus: A case-control study. *Atherosclerosis* 197 :931–936.