

Polimorfismos genéticos en enfermedades cardiovasculares. La experiencia en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

Gilberto Vargas Alarcón*

Resumen

El conocimiento de la secuencia completa del genoma humano y la aplicación de nuevas técnicas moleculares ha generado importante información acerca de los marcadores genéticos asociados con el desarrollo de enfermedad. Las enfermedades cardiovasculares han tenido especial interés en estos estudios dada su importancia como problema de salud a nivel mundial. Las enfermedades cardiovasculares tienen una etiología multifactorial con participación de factores genéticos y ambientales, por lo que la identificación de genes de susceptibilidad tiene relevancia para el desarrollo de nuevos tratamientos y la predicción del riesgo de enfermedad. Así, la estrategia ha sido analizar los polimorfismos presentes en genes candidatos que codifican para proteínas importantes en el sistema homeostático encargado de mantener el buen funcionamiento del sistema cardiovascular. Se han reportado varios estudios en poblaciones caucásicas, asiáticas y africanas pero hay pocos datos en la población mexicana. En la presente revisión se discuten algunos de los datos publicados de marcadores polimórficos asociados con enfermedades cardiovasculares en la población mexicana.

Palabras clave: Etiología. Enfermedades cardiovasculares. Factores ambientales. Factores genéticos. Marcadores genéticos. Susceptibilidad. Polimorfismos.

Key words: Etiology. Cardiovascular diseases. Environmental factors. Genetic factors. Genetic markers. susceptibility. Polymorphisms.

Summary

GENETIC POLYMORPHISMS IN CARDIOVASCULAR DISEASES. THE EXPERIENCE IN THE NATIONAL INSTITUTE OF CARDIOLOGY “IGNACIO CHÁVEZ”

The knowledge of the complete human genome sequence and the application of new molecular techniques is providing important information about the genetic markers associated with the development of several diseases. Cardiovascular diseases are of special interest for these studies since they are an important worldwide health problem. These diseases have a multifactorial etiology, therefore, many genetic and environmental factors participate to generate them. The identification of susceptibility genes has the potential to aid in the development of new treatments and to enhance the prediction of disease risk. Thus, the strategy has been to analyze polymorphisms presents in candidate genes coding for important proteins in the homeostatic system involved in maintaining cardiovascular health. Several studies have been reported in caucasian, asian and african populations, however, few data are available in the mexican population. The revision discusses recently published data of polymorphic markers associated with cardiovascular disease in the Mexican population.

(Arch Cardiol Mex 2007; 77, S4, 88-93)

www.medigraphic.com

* Investigador en Ciencias Médicas “F”. Departamento de Fisiología. Grupo de Estudio en Genómica y Proteómica en Enfermedades Cardiovasculares. Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Correspondencia: Dr. Gilberto Vargas Alarcón. Departamento de Fisiología. Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. (INICIH Juan Badiano Núm. 1, Col. Sección XVI. Tlalpan 14080, México D.F.). Tel: (52) 55 55 73 29 11, ext: 1278. Fax: (52) 55 55 73 09 26. E-mail: gvargas63@yahoo.com

Introducción

La culminación del Proyecto del Genoma Humano dio como resultado el conocimiento de la secuencia completa de los 3,200 millones de nucleótidos contenidos en el genoma. Un punto importante que se estableció con este proyecto fue que los seres humanos compartimos el 99.9% de esta secuencia y que solamente el 0.1% varía entre cada individuo. Estas variaciones son principalmente cambios de una sola base (SNP-single nucleotide polymorphism) que se localizan en promedio una por cada 1,000 nucleótidos. Las diferentes combinaciones de SNPs dan lugar a la individualidad genómica y por tanto a la susceptibilidad o resistencia a desarrollar ciertas enfermedades comunes como la hipertensión, la diabetes, el infarto del miocardio, entre otras. Los estudios del papel de los polimorfismos genéticos en el desarrollo de enfermedades nos permitirán identificar a los individuos con riesgo a desarrollar la enfermedad antes de que aparezcan los síntomas y así evitar o retrasar las manifestaciones y secuelas de la misma. Así, se podrá definir qué individuos presentarán una enfermedad más grave permitiendo definir mejores estrategias de tratamiento.

Importancia de los estudios en México

Dado que las secuencias contenidas en el genoma se heredan de padres a hijos, éstas son características de cada población. Es decir, los genes de susceptibilidad y resistencia encontrados en poblaciones caucásicas, asiáticas y negras no podrán ser considerados para la población mexicana. Nuestra población presenta características genéticas diferentes a las poblaciones mencionadas, ya que nuestra carga genética está formada por una mezcla de genes caucásicos e indígenas que se han estado combinando desde hace más de 500 años. Diversos estudios utilizando marcadores de diferentes cromosomas han establecido que la población mestiza mexicana contiene un 56% de genes amerindios, un 40% de genes caucásicos y un 4% de genes negroides.¹⁻³ Estudios más recientes analizando diferentes genes, entre los que destacan los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC- major histocompatibility complex), el gen de la enzima convertora de angiotensina, el gen de la paraoxonasa y el gen del receptor beta1 adrenérgico, han corroborado esta distribución.⁴⁻⁸ Esta información hace necesario el estudio de la genética de las enfermedades cardiovasculares en la población mexicana.

Estrategias de estudio

En general la búsqueda de genes o polimorfismos genéticos involucrados en la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades implica dos estrategias de estudio que son por un lado los análisis de ligamiento genético y por otro los estudios de asociación.⁹ Los análisis de ligamiento permiten ubicar al posible gen de susceptibilidad a lo largo de todo el genoma utilizando marcadores específicos conocidos como marcadores de microsatélites. Este tipo de análisis requiere contar con muestras de familias que tengan varios individuos afectados, es decir, familias de casos múltiples. Sin embargo, este tipo de análisis está limitado ya que no en todos los casos las enfermedades se presentan en familias y, por otro lado, se ha visto que se requiere de un número muy grande de familias de este tipo para obtener resultados confiables. Además, después de haber ubicado la región que contiene al probable gen de susceptibilidad, se requiere analizar el o los genes por estudios de asociación. Por otro lado, para los estudios de asociación se requiere contar con muestras de casos y controles. Para realizar este tipo de estudios se requiere definir cuáles serán los genes candidatos que se investigarán, lo cual depende del conocimiento de la fisiopatogenia del padecimiento en cuestión. Es un tipo de análisis más directo pero tiene como limitante el poco conocimiento que se tiene de los mecanismos fisiopatogénicos implicados en algunas enfermedades.

Genes candidatos en enfermedades cardiovasculares

En el caso de las enfermedades cardiovasculares la estrategia que se ha utilizado hasta el momento es el tratar de identificar a los genes candidatos de estudio. Estos genes han sido identificados tomando en cuenta el conocimiento que se tiene de los diferentes sistemas involucrados en mantener en buen estado el sistema cardiovascular.^{10,11} Una vez detectados se han evaluado dichos genes en estudios de asociación con individuos no relacionados. Los genes candidatos están incluidos en varios grupos de acuerdo al sistema o mecanismo en los cuales pueden estar involucrados. De esta forma tenemos los genes que codifican para proteínas que participan en el metabolismo de los lípidos, los genes que codifican para proteínas involucradas en los procesos de coagulación y fibrinólisis, los genes que codifican proteínas relacionadas con la

circulación sanguínea y el crecimiento vascular, los genes que codifican para factores metabólicos y finalmente los genes que codifican proteínas involucradas en los procesos inflamatorios¹²⁻¹⁵ (*Tabla I*).

Estudios en el Instituto

Considerando la gran importancia que tienen los estudios de genes candidatos en las enfermedades cardiovasculares y partiendo del hecho de que los estudios previos en otras poblaciones no pueden aplicarse a la población mexicana por las características genéticas previamente discutidas,

en nuestro Instituto nos hemos dado a la tarea de realizar estudios de polimorfismos genéticos asociados con enfermedades cardiovasculares. Lógicamente el número de enfermedades y de polimorfismos genéticos que se pueden estudiar es muy grande, por tal razón nosotros nos hemos enfocado a las enfermedades más relevantes y con mayor prevalencia como son: los síndromes isquémicos coronarios, las miocardiopatías, la hipertensión, las cardiopatías congénitas y las arritmias. A continuación se describen algunos de los resultados que hemos obtenido en dichos estudios y que se resumen en la *Tabla II*.

Tabla I. Genes candidatos de estudio en enfermedades cardiovasculares.

1. Metabolismo de lípidos.	— Apolipoproteína B (ApoB) — Apolipoproteína E (ApoE) — Lipoprotein-lipasa (LPL) — Proteína que transfiere ésteres de colesterol (CETP)
2. Coagulación y fibrinólisis.	— Glicoproteína IIIa del receptor de plaquetas (GP) — Glicoproteína Ia del receptor de colágena (GP Ia). — Fibrinógeno — Factor VII — Inhibidor del activador del plasminógeno — Factor XIII
3. Circulación y crecimiento vascular:	— Enzima convertidora de angiotensina (ECA). — Angiotensinógeno (AGT). — Receptor tipo I de angiotensina II
4. Factores metabólicos.	— Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).
5. Moléculas proinflamatorias.	— Interleucina 1 — Interleucina 6 — Factor de necrosis tumoral alfa

Tabla II. Polimorfismos genéticos analizados en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

Gen	Sujetos de estudio	Hallazgos
ApoE	Individuos sanos	Asociación de genotipos E3/4 y E2/3 con niveles alterados de lípidos
HLA-DR HLA-DQ	Pacientes con CRI	Asociación con el alelo HLA-DR16
TNF-alfa HLA-DR HLA-DQ	Pacientes con CRI Pacientes con enfermedad de Chagas	Asociación con los polimorfismos -238 y -308 Asociación de los alelos HLA-DR4 y HLA-B39 con la infección por <i>T. Cruzi</i> . Asociación del alelo HLA-DR16 con el daño cardíaco.
TNF-alfa HLA-B	Pacientes con enfermedad de Chagas Pacientes con Arteritis de Takayasu	Asociación con el polimorfismo -308 Asociación con residuos en posiciones 63 y 67 de la molécula HLA-B
PON1 Receptor B1-adrenérgico HLA-DR HLA-DQB	Individuos sanos Pacientes con CDI Pacientes con CDI	No se detectó asociación con niveles de lípidos Asociación con el polimorfismo Arg389Gly Asociación con los alelos HLA-DR4 y HLA-DQB*0301
ECA	Pacientes con EAC	Asociación con el alelo D y el genotipo DD

Abreviaturas: CDI = cardiomiopatía dilatada idiopática, CRI = cardiopatía reumática inactiva, EAC = enfermedad arterial coronaria, ECA = enzima convertidora de angiotensina, HLA = antígenos leucocitarios humanos, PON1 = paraoxonasa, TNF = factor de necrosis tumoral.

Polimorfismos de la enzima convertidora de angiotensina

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) está codificada en el cromosoma 17 y presenta un polimorfismo que depende de la inserción o delección (ID) de un fragmento de 287 pb. La frecuencia de los alelos que se generan por este polimorfismo ha sido estudiada en diversas poblaciones y su asociación con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares ha sido evaluada.¹⁶⁻¹⁸ La mayoría de los estudios realizados incluyen a poblaciones caucásicas y orientales. Debido al impacto que tiene el polimorfismo de la ECA en la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y a lo heterogéneo de su distribución en los distintos grupos étnicos, el objetivo de nuestro trabajo fue determinar las frecuencias génicas de los alelos de la ECA en la población mexicana tanto mestiza como indígena y tratar de establecer su papel como marcador de susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria.^{6,19} Nuestros resultados muestran por primera vez la distribución de las frecuencias de este polimorfismo en poblaciones mexicanas estableciendo importantes diferencias entre las poblaciones mexicanas y las caucásicas, asiáticas y africanas. Por otro lado, se detectó una asociación entre la presencia del alelo D y del genotipo DD y el desarrollo de enfermedad arterial coronaria, sin embargo, no detectamos correlación entre el polimorfismo y los niveles de lípidos medidos en los pacientes.

Polimorfismos del gen del receptor B1 adrenérgico

En condiciones fisiológicas la frecuencia cardíaca y la contractilidad miocárdica están bajo el control del receptor beta1 adrenérgico. El gen que codifica este receptor presenta dos sitios polimórficos localizados en las posiciones A145G (Ser49Gly) y C1165G (Arg389Gly). Estos sitios se asocian con la susceptibilidad genética a varios tipos de enfermedades cardiovasculares y a factores de riesgo cardiovascular como la obesidad, la hipertensión, la diabetes, la insuficiencia cardíaca y la miocardiopatía dilatada.^{20,21} Los reportes sugieren que existen diferencias étnicas en las frecuencias de ambos polimorfismos. Por lo anterior, decidimos estudiar la distribución de dichos polimorfismos en la población mexicana y establecer su papel como marcador de susceptibilidad para el desarrollo de la miocardiopatía dilatada idiopática

(MDI).^{22,23} Los resultados mostraron importantes diferencias en la distribución de los distintos alelos en las poblaciones mexicanas al comparlas con las poblaciones europeas, asiáticas y africanas. El estudio en los pacientes mostró asociación del polimorfismo Arg389Gly con el desarrollo de la MDI.

Polimorfismos asociados con enfermedad de Chagas

La patogénesis de la enfermedad de Chagas aún no está bien definida, aunque se ha propuesto que un mecanismo autoinmune podría explicarla.^{24,25} Diversos estudios han sugerido la participación de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y del factor de necrosis tumoral alfa en el desarrollo de esta enfermedad.^{26,27} Los genes del CMH codifican moléculas que participan en la iniciación y regulación de la respuesta inmune y el TNF-alfa es una citocina pro inflamatoria. Dado el carácter autoinmune de la enfermedad, nuestro grupo se dedicó a estudiar ambos genes (MHC y TNF-alfa) en un grupo de pacientes con enfermedad de Chagas (crónicos y asintomáticos) con el fin de definir su papel como marcadores de susceptibilidad para el desarrollo de este padecimiento.^{28,29} Los resultados obtenidos sugieren que los alelos del CMH se asocian con el desarrollo de la infección crónica y el daño cardíaco en la enfermedad de Chagas. Los alelos HLA-DR4 y HLA-B39 podrían asociarse con la infección por el *T. cruzi*, mientras que el alelo HLA-DR16 podría ser un marcador de susceptibilidad para el daño cardíaco. En el caso del TNF-alfa, los datos indican también una asociación con el alelo mutante en la posición -308 del gen.

Polimorfismos asociados con la cardiopatía reumática

La fiebre reumática y la cardiopatía reumática son consideradas el resultado de respuestas autoinmunes anormales posteriores a una faringitis por un estreptococo del grupo A.^{30,31} Debido a la participación importante del sistema inmune en el desarrollo de la enfermedad, los factores genéticos implicados en su presentación podrían incluir a genes localizados en el CMH. Considerando estos antecedentes, decidimos estudiar los genes del CMH y los del TNF-alfa en un grupo de pacientes con cardiopatía reumática inactiva.^{32,33} Dichos pacientes fueron divididos en aquellos que tenían daño en la válvula mitral

y aquellos que tenían daño en múltiples válvulas. Los resultados de estos estudios sugieren una importante participación del alelo HLA-DR16 en la susceptibilidad al desarrollo de la CRI. Este alelo también podría jugar un papel importante en determinar el patrón de daño valvular ya que se encontró con mayor frecuencia en aquellos pacientes que presentaron daño en múltiples válvulas. En lo que respecta al TNF-alfa, se demostró una participación importante de los polimorfismos en las posiciones -238 y -308 como marcadores de susceptibilidad para la CRI, sin embargo, no tienen ningún papel en determinar el tipo de daño valvular que se presenta en dichos pacientes.

Conclusiones

En los últimos 20 años de estudio en la genética de las enfermedades cardiovasculares se ha generado información muy importante. Una serie de marcadores han sido asociados con el desarrollo de estas enfermedades y de forma impor-

tante se han notado variaciones de acuerdo a las poblaciones estudiadas. Debido a que muchos de los estudios han sido realizados en series con un escaso número de pacientes, el uso de los meta-análisis ha ayudado en definir el posible papel de muchos polimorfismos en genes candidatos. Las diferencias étnicas hacen meritorio el realizar estudios locales considerando la carga genética de cada población. La población mexicana es característica desde el punto de vista genético ya que incluye genes tanto caucásicos como amerindios en alta proporción. Lo anterior sugiere que los datos reportados en otras poblaciones no se pueden aplicar a la población mexicana. Por lo anterior actualmente en México se están haciendo esfuerzos para tratar de definir los marcadores genéticos asociados con el desarrollo de estas enfermedades. Esto permitirá en un futuro detectar individuos con alto riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, lo cual a su vez tendrá consecuencias importantes en la prevención y tratamiento de las mismas.

Referencias

1. LISKER R, PEREZ-BRICENO R, GRANADOS J, BABINSKY V, DE RUBENS J, ARMENDARES S, ET AL: *Gene frequencies and admixture estimates in a Mexican City population*. Am J Physical Anthropol 1986; 71: 203-207.
2. LISKER R, PÉREZ-BRICEÑO R, GRANADOS J, BABINSKY V: *Gene frequencies and admixture estimates in the State of Puebla, Mexico*. Am J Physical Anthropol 1988; 76: 331-335.
3. LISKER R, RAMIREZ E, PÉREZ-BRICEÑO R, GRANADOS J, BABINSKY V: *Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican Urban Centers*. Hum Biology 1990; 62: 791-801.
4. VARGAS-ALARCON G, HERNANDEZ-PACHECO G, MOSCOSO J, PEREZ-HERNANDEZ N, MURGUIA LE, MORENO A, ET AL: *HLA genes in Mexican Teeneks: HLA genetic relationship with other worldwide populations*. Mol Immunol 2006; 43: 790-799.
5. VARGAS-ALARCON G, MOSCOSO J, MARTINEZ-LASO J, RODRIGUEZ-PEREZ JM, FLORES-DOMINGUEZ C, SERRANO-VELA JI, ET AL: *Origin of Mexican Nahuas (Aztecs) according to HLA genes and their relationships with worldwide populations*. Mol Immunol 2007; 44: 747-755.
6. VARGAS-ALARCON G, HERNANDEZ-PACHECO G, RODRIGUEZ-PEREZ JM, PEREZ-HERNANDEZ N, PAVON Z, FRAGOSO JM, ET AL: *Angiotensin-converting enzyme gene (ACE) insertion/deletion polymorphism in Mexican populations*. Hum Biol 2003; 75: 889-896.
7. GAMBOA R, ZAMORA J, RODRIGUEZ-PEREZ JM, FRAGOSO JM, CARDOSO G, POSADAS-ROMERO C, VARGAS-ALARCON G: *Distribution of paraoxonase PON1 gene polymorphisms in Mexican populations. Its role in the lipid profile*. Exp Mol Pathol 2006; 80: 85-90.
8. FRAGOSO JM, RODRIGUEZ-PEREZ JM, PEREZ-VIELMA N, MARTINEZ-RODRIGUEZ N, VARGAS-ALARCON G: *Beta1 adrenergic receptor polymorphisms Arg389Gly and Ser49Gly in the Amerindian and Mestizo populations of Mexico*. Hum Biol 2005; 77: 515-520.
9. YUEI P, MELAMUD E, MOULT J: *SNPs3D: Candidate gene and SNP selection for association studies*. BMC Bioinformatics 2006; 7: 166-174.
10. CASAS JP, COOPER J, MILLER GJ, HINGORANI AD, HUMPHRIES SE: *Investigating the Genetic Determinants of Cardiovascular Disease Using Candidate Genes and Meta-analysis of Association Studies*. Ann Hum Genet 2006; 70: 145-169.
11. BERG K: *Genetics of coronary heart disease and its risk factors*. CIBA Foundation Symposium 1987; 130: 14-133.
12. KEAVNEY B: *Genetic epidemiological studies of coronary heart disease*. Int J Epidemiol 2002; 31: 730-736.
13. LIBBY P: *Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art*. Am J Cardiol 2003; 91(3A): 3A-6A.
14. RADER DJ, MAUGEAIS C: *Genes influencing HDL metabolism: new perspectives and implications*

- for atherosclerosis prevention. *Mol Med Today* 2000; 6: 170-175.
15. YAMADA Y: *Identification of genetic factors and development of genetic risk diagnosis systems for cardiovascular diseases and stroke*. *Circ J* 2006; 70: 1240-1248.
 16. MATTU RK, NEEDHAM EW, GALTON DJ, FRANGOS E, CLARK AJ, CAULFIELD M: *A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caerphilly heart study*. *Circulation* 1995; 91: 270-274.
 17. NAKAI K, ITOH C, MIURA Y, HOTTA K, MUSA T, ITHO T, ET AL: *Deletion polymorphism of the angiotensin I- converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese*. *Circulation* 1994; 90: 2199-2202.
 18. CAMBIEN F, POIRIER O, LECERF L, EVANS A, CAMBOU JP, ARVEILER D, ET AL: *Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction*. *Nature* 1992; 359: 641-644.
 19. VARGAS-ALARCON G, ZAMORA J, SANCHEZ-GARCIA S, RODRIGUEZ-PEREZ JM, CARDOSO G, POSADAS-ROMERO C: *Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism in Mexican patients with coronary artery disease. Association with the disease but not with lipid levels*. *Exp Mol Pathol* 2006; 81: 131-135.
 20. IWAI C, AKITA H, SHIGA N, TAKAI E, MIYAMOTO Y, SHIMIZU M, ET AL: *Suppressive effect of the Gly389 allele of the beta1-adrenergic receptor gene on the occurrence of ventricular tachycardia in dilated cardiomyopathy*. *Circ J* 2002; 66: 723-728.
 21. FELDMAN MD: *Adrenergic receptor polymorphism and cardiac function (and dysfunction)*. *Circulation* 2001; 103: 1042-1043.
 22. FRAGOSO JM, RODRIGUEZ-PEREZ JM, PEREZ-VIELMA N, MARTINEZ-RODRIGUEZ N, VARGAS-ALARCON G: *Beta1 adrenergic receptor polymorphisms Arg389Gly and Ser49Gly in the Amerindian and Mestizo populations of Mexico*. *Hum Biol* 2005; 77: 515-520.
 23. FRAGOSO JM, RODRIGUEZ-PEREZ JM, GONZALEZ J, CRUZ D, PEREZ-MENDEZ O, DE JESUS GARCIA J, ET AL: *Beta1-adrenergic receptor gene polymorphisms in Mexican patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. *Exp Mol Pathol* 2006; 80: 279-282.
 24. CUNHA-NETO E, KALIL J: *Heart-infiltrating and peripheral T cells in the pathogenesis of human Chagas' disease cardiomyopathy*. *Autoimmunity* 2001; 34: 187-192.
 25. KIERSZENBAUM F: *Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas' disease pathogenesis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 37: 1-11.
 26. BERAUN Y, NIETO A, COLLADO MD, GONZALEZ A, MARTIN J: *Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease*. *Tissue Antigens* 1998; 52: 81-83.
 27. COLORADO IA, ACQUATELLA H, CATALIOTI F, FERNANDEZ MT, LAYRISSE Z: *HLA class II DRB1, DQB1, DPB1 polymorphism and cardiomyopathy due to Trypanosoma cruzi chronic infection*. *Hum Immunol* 2000; 61: 320-325.
 28. CRUZ-ROBLES D, REYES PA, MONTEON-PADILLA VM, ORTIZ-MUNIZ AR, VARGAS-ALARCON G: *MHC class I and class II genes in Mexican patients with Chagas disease*. *Hum Immunol* 2004; 65: 60-65.
 29. RODRIGUEZ-PEREZ JM, CRUZ-ROBLES D, HERNANDEZ-PACHECO G, PEREZ-HERNANDEZ N, MURGUIA LE, GRANADOS J, ET AL: *Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease*. *Immunol Lett* 2005; 98: 97-102.
 30. AMIGO MC, MARTÍNEZ-LAVÍN M, REYES PA: *Acute rheumatic fever*. *Rheum Dis Clin North Am* 1993; 19: 333-350.
 31. MILLER LC, GRAY ED, MANSOUR M, ABDIN ZH, KAMEL R, ZAHER S, ET AL: *Cytokines and immunoglobulin in rheumatic heart disease: production by blood and tonsillar mononuclear cells*. *J Rheumatol* 1989; 16: 1436-1442.
 32. HERNANDEZ-PACHECO G, AGUILAR-GARCIA J, FLORES-DOMINGUEZ C, RODRIGUEZ-PEREZ JM, PEREZ-HERNANDEZ N, ALVAREZ-LEON E, ET AL: *MHC class II alleles in Mexican patients with rheumatic heart disease*. *Int J Cardiol* 2003; 92: 49-54.
 33. HERNANDEZ-PACHECO G, FLORES-DOMINGUEZ C, RODRIGUEZ-PEREZ JM, PEREZ-HERNANDEZ N, FRAGOSO JM, SAUL A, ET AL: *Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with rheumatic heart disease*. *J Autoimmun* 2003; 21: 59-63.