

Antígenos de histocompatibilidad e infarto de miocardio

Igrid García González^a, Servando Agramonte Pereira^b, José Eugenio Negrín Expósito^c, Carmen Rosa Perera Lombillo^d y José Emilio Fernández-Brito Rodríguez^c

^aGrupo de Bioquímica. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ciudad de La Habana. Cuba.

^bServicio de Cardiología. Hospital Clínico Quirúrgico Docente Joaquín Albañán. Ciudad de La Habana. Cuba.

^cCentro de Investigaciones y Referencias de Aterosclerosis de La Habana (CIRAH). Ciudad de La Habana. Cuba.

^dServicio de Cardiología. Hospital Clínico Quirúrgico Carlos J. Finlay. Ciudad de La Habana. Cuba.

Introducción. Los polimorfismos genéticos están considerados como los nuevos factores de riesgo para la enfermedad coronaria. Dentro de estos genes podría incluirse al complejo mayor de histocompatibilidad, dada la naturaleza inflamatoria de esta patología. El objetivo de este estudio fue conocer si existe asociación entre el complejo mayor de histocompatibilidad y el infarto de miocardio.

Métodos. Se realizó la determinación de los antígenos de histocompatibilidad por el método de microlinfocitotoxicidad en 2 pasos modificado para doble fluorescencia, en 60 pacientes masculinos con antecedentes de infarto de miocardio y 142 donantes sanos, y se estudió la relación con algunos factores de riesgo cardiovasculares.

Resultados. Se encontró asociación positiva con los antígenos DR4 (*odds ratio* [OR] = 3,75; $p < 0,025$; intervalo de confianza [IC] del 95%, 0,60-2,45) y B8 (OR = 4,37; $p < 0,025$; IC del 95%, 1,69-3,11) para el infarto de miocardio en comparación con los controles. El antígeno B15 (1,66 frente al 16,66%, $p < 0,001$; OR = 0,14; $p < 0,007$; IC del 95%, 0,06-0,63) resultó el menos frecuente en el grupo de pacientes, pudiendo ser útil como

marcador de protección. Asimismo, la frecuencia de los haplotipos B8-DR4 (1,2 frente al 9,0%, $p < 0,001$; OR = 7,50; $p < 0,0003$; IC del 95%, 2,15-4,17) y B8-DR3 (8,5 frente al 2,3%, $p < 0,001$; OR = 3,70; $p < 0,004$; IC del 95%, 2,50-5,12) fue significativamente mayor. Los pacientes DR4 positivos mostraron mayor predisposición para desarrollar múltiples infartos, mientras que los B8 tuvieron mayores antecedentes familiares de cardiopatía isquémica, sin que se encontraran diferencias significativas con los otros factores de riesgo estudiados.

Conclusiones. Se encontró asociación entre el sistema mayor de histocompatibilidad y el infarto de miocardio, así como evidencias sobre la posible naturaleza autoinmune de dicho episodio.

Palabras clave:

Antígenos HLA. Aterosclerosis. Autoinmunidad. Infarto de miocardio.

HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS AND MYOCARDIAL INFARCTION

Introduction. Genetic polymorphisms have recently been identified as a risk factor for coronary heart disease. Because of the inflammatory nature of this disease, major histocompatibility complex may be included among these genes. The aim of this study was to investigate whether major histocompatibility complex is involved in conferring resistance or susceptibility to myocardial infarction.

Methods. Selected human leukocyte antigens (HLA) were studied by the classical two-step microlymphocytotoxicity assay modified for

Correspondencia: Dra. I. García González.
Grupo de Bioquímica. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM).
Av. 26, N.º 1605 Boyeros y Puentes Grandes.
10600 Ciudad de la Habana. Cuba
Correo electrónico: igprod@infomed.sld.cu

Recibido el 23 de febrero de 2006 y aceptado el 11 de enero de 2007.

double staining in 60 male patients with a history of myocardial infarction and 142 healthy donors. Several risk factors were analyzed.

Results. Positive associations with HLA-DR4 (odds ratio [OR] = 3.75; $p < 0.025$; 95% confidence interval [CI], 0.60-2.45) and B8 (OR = 4.37; $p < 0.025$; 95% CI, 1.69-3.11) antigens were found for myocardial infarction compared with healthy controls. The frequency of HLA-B15 antigen was lower in the patient group (1.66% vs. 16.66%, $p < 0.001$; OR = 0.14; $p < 0.007$; 95% CI, 0.06-0.63), which would suggest that this antigen is probably a protective factor against myocardial infarction. The frequency of haplotypes B8-DR4 (1.2% vs. 9.0, $p < 0.001$; OR = 7.50; $p < 0.0003$; 95% CI, 2.15-4.17) and B8-DR3 (8.5% vs. 2.3%, $p < 0.001$; OR = 3.70; $p < 0.004$; 95% CI, 2.50-5.12) was significantly increased in the patient group. DR4-positive patients showed a strong predisposition to developing multiple infarctions, while HLA-B8 positive patients more frequently had a familial history of coronary heart disease. No significant differences were observed between the presence of HLA-DR4 and B8 and the risk factors analyzed.

Conclusions. An association was found between major histocompatibility complex and myocardial infarction, as well as evidence of the possible autoimmune nature of this event.

Key words:

HLA antigens. Atherosclerosis. Autoimmunity. Myocardial infarction.

A partir del descubrimiento de las moléculas de histocompatibilidad y su papel como elementos de restricción de la respuesta inmune, los estudios de asociación de estos genes y diversas enfermedades han cobrado gran interés, en especial en aquellas patologías en las que el sistema inmune desempeña un papel preponderante en la etiología y en la evolución del cuadro clínico¹.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria, porque es mucho más que la simple acumulación de lípidos en la pared arterial. Sus lesiones abarcan una serie de respuestas celulares y moleculares específicas, las cuales aparecen desde las etapas iniciales de la enfermedad². La intensidad y persistencia de esta respuesta inflamatoria podría estar determinada genéticamente³.

Se sabe que el infarto de miocardio –y en general toda la patología aterosclerótica– tiene un componente hereditario importante^{4,5}. En la última dé-

cada las técnicas de biología molecular han permitido identificar numerosos genes responsables del aumento del riesgo. Estos polimorfismos genéticos están siendo considerados como los nuevos factores de riesgo para la aterosclerosis coronaria, y han hecho pensar en la hipótesis de que la suma de los que resultan desfavorables en presencia de un ambiente propicio podría facilitar la aparición de esta enfermedad típicamente poligénica y multifactorial⁵. Dentro de estos genes o grupos de genes podría estar implicado el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o sistema HLA (acrónimo de *Human Leucocyte Antigens*), por ser el principal elemento en el reconocimiento antigenico y en la iniciación de la respuesta inmune, y sus antígenos podrían servir como marcadores de susceptibilidad para desarrollar enfermedad coronaria de acuerdo con el perfil genético individual.

Este estudio tiene como objetivo determinar si existe asociación entre el sistema HLA y la enfermedad coronaria en pacientes con antecedentes de infarto de miocardio y factores de riesgo tradicionales e historia familiar de cardiopatía isquémica (CI).

Material y métodos

Se realizó un estudio de casos y controles con 60 pacientes varones seleccionados al azar, de entre 38 y 72 años de edad, con historia de uno o más infartos de miocardio, diagnosticados según criterios clínicos y electrocardiográficos con antecedentes de hipertensión arterial, tabaquismo y/o historia familiar de CI, procedentes de servicios de cardiología de 3 centros médicos de la ciudad de La Habana. Se excluyeron los pacientes con antecedentes de enfermedad cerebrovascular y autoinmune. Como controles se seleccionó a 142 donantes voluntarios, supuestamente sanos y no relacionados, sin evidencias clínicas de enfermedad cardíaca ni autoinmune, y que representaban los principales componentes raciales de la población cubana⁶ (tabla 1).

En el grupo de pacientes se estudió la relación entre los antígenos de significación encontrados y las variables: número de infartos, edad de ocurrencia del episodio, tabaquismo, hipertensión arterial e historia familiar de CI. Se establecieron 3 grupos de edad: de 38 a 49, de 50 a 64 y mayores de 65 años. Se consideró fumador al sujeto que fumaba uno o más cigarrillos al día, que lo había hecho durante un año o más y que había fumado durante el último año. Como no fumador al que nunca había fumado o que lo había hecho 2 años antes o más de iniciarse este estudio. Se consideró hipertenso al paciente que recibía tratamiento o refirió haberse diagnosticado la enfermedad. Para el análisis de la historia familiar de CI se consideró primer grado de parentesco (padres o hermanos).

La determinación serológica de los antígenos HLA clase I y II se realizó mediante la técnica de microlinfocitotoxicidad en 2 pasos^{7,8} modificada para doble fluorescencia⁹. Las células mononucleares periféricas se obtuvieron mediante la técnica de Böyum modificada¹⁰, y la separación de los linfocitos T y B se realizó por fibra de nylon¹¹. Los linfocitos T se ajustaron a 2×10^6 células/ml, y los B, a 2.5×10^6 células/ml, haciendo reaccionar con sueros específicos anti-HLA clase I y II, respectivamente, en presencia de suero de conejo como fuente de comple-

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes y controles

Variables	Pacientes (n = 60)	Controles (n = 142)	Valor de p
Edad media (años)	58,4 ± 10,3	38,1 ± 5,7	< 0,001
Hipertensión arterial, % (n)	68,7 (41)	41,3 (59)	< 0,05
Tabaquismo, % (n)	71,4 (43)	68,7 (97)	NS
Historia familiar de cardiopatía isquémica, % (n)			
No	18,3 (11)	73,2 (104)	
Un pariente	65,0 (39)	22,5 (32)	
Dos o más familiares	16,7 (10)	4,23 (6)	< 0,05

La hipertensión se definió como presión arterial sistólica (PAS) >140 mmHg y presión arterial diastólica (PAD) >90 mmHg.

Tabla 2. Odds ratio y fracción etiológica de los antígenos más frecuentes encontrados en los pacientes

Antígenos	OR	IC del 95%	Valor de p < 0,05	FE (%)
A24	1,4	0,96-2,36	0,007	0,15
B8	4,37	2,17-4,36	0,025	0,31
DR3	2,55	1,65-4,21	0,027	0,18
DR4	3,75	1,69-5,25	0,025	0,40

FE: fracción etiológica; IC: intervalo de confianza; OR: odds ratio.

mento. La lectura de las placas se realizó en un microscopio invertido de doble fluorescencia (sistema Patimed-Leica)⁹.

Ánálisis estadístico

Se calcularon las frecuencias antigénicas (f) y haplotípicas (fh) para pacientes y controles utilizando un software de genética de poblaciones¹². La significación estadística de la asociación se calculó mediante la prueba de χ^2 para un valor de $p \leq 0,05$. El grado de asociación se determinó a través de los *odds ratio* (OR) como una aproximación para estimar los riesgos relativos que confiere la presencia de la variable en relación con su ausencia, y sus correspondientes intervalos de confianza (IC) del 95%¹³.

Se calculó la fracción etiológica (FE) para determinar qué porcentaje del OR es atribuible al antígeno considerado, si el riesgo se debe o no al marcador estudiado, o es debido a otro en desequilibrio de ligamiento con él¹³. Mediante el análisis de independencia y asociaciones antigénicas (AIAA) se determinaron las asociaciones significativas, la independencia o no de un antígeno respecto a otro, y si es debido o no al fenómeno de desequilibrio de ligamiento (D)¹⁴.

La relación entre los antígenos de susceptibilidad y las variables independientes se analizó con el método de aproximación logarítmica o prueba G (Microsoft Excel 2000 y Statgraphics Plus 2.1 1996).

Resultados

Para pacientes y controles se utilizaron 117 sueros anti-HLA de clase I, mono u oligoespecíficos, y 68 de clase II, los cuales representan las especificidades HLA serológicas más frecuentes de la población cubana¹⁵.

Los antígenos significativamente más frecuentes fueron: HLA-DR4, DR3, B8 y A24. Sin embargo, la FE permitió definir una verdadera asociación para

el DR4 y el B8 (tabla 2). El antígeno menos frecuente con respecto al grupo control fue el B15 (1,66 frente al 16,66%; $p < 0,001$), cuyo OR de 0,14 (IC del 95%, 0,41-1,82; $p < 0,027$) y fracción preventiva de 0,12 indicaron una asociación negativa para el infarto de miocardio, pudiendo considerarse como marcador de protección. Los haplotipos bilocus más frecuentes significativamente fueron: B8-DR4, B8-DR3 y A2-B44 (tabla 3).

No se encontraron diferencias significativas entre pacientes positivos y negativos para ninguno de los 2 antígenos de susceptibilidad para las variables edad de ocurrencia del infarto, hipertensión arterial y tabaquismo. Para el número de infartos hubo significación para el antígeno DR4 ($p = 0,0025$), con una prevalencia de 2 episodios en los pacientes con este marcador (61%) (fig. 1). El fenotipo B8 resultó significativo para la historia familiar de CI ($p = 0,004$) (fig. 2).

Discusión

No existe un criterio definitivo sobre la asociación del sistema HLA con las cardiopatías, pues los antígenos de susceptibilidad comunicados son diversos (A3, A24, B8, B51, B52, DR1, DR4, DR7)¹⁶⁻²⁰. Las discrepancias encontradas se deben fundamentalmente a diferencias raciales.

En este estudio se encontró asociación entre el sistema HLA y el infarto de miocardio para los antígenos HLA-DR4 y B8. La FE para el A24 indica que por sí solo no constituye un antígeno de susceptibilidad. Su elevada frecuencia en los pacientes se debe a un sesgo racial por la alta presencia de individuos caucásicos. Este antígeno es característico de este grupo étnico y frecuente en la población cubana (28,18%; $p = 0,017$). En el caso del DR3, la FE indica la posibilidad de desequilibrio de ligamiento con otro alelo, por lo que también fue descartado.

No se consideró de susceptibilidad el haplotipo A2-B44, porque la significación se debe a su alta frecuencia en la población cubana¹⁵. El AIAA indi-

Tabla 3. Haplótipos bilocus más frecuentes encontrados en pacientes y controles

Haplótipos	Pacientes (f, %)	Controles (f, %)	OR (%)	IC del 95%	Valor de p < 0,05
A2-B44	8	4,1	2,95	1,40-5,75	0,02
B8-DR3	8,5	2,3	3,70	2,50-6,12	0,004
B8-DR4	9	1,2	7,50	2,15-4,17	0,0003

f: frecuencia; IC: intervalo de confianza; OR: *odds ratio*.

có la presencia de desequilibrio de ligamiento ($D = 2,8\%$; $p = 0,0003$), lo cual afianzó nuestro criterio de exclusión y confirmó el de susceptibilidad para los haplotipos B8-DR4 ($D = 1,0\%$; $p = 0,014$) y B8-DR3 ($D = 1,9\%$; $p = 0,0007$).

Relación de los antígenos HLA-DR4 y B8 con la edad de ocurrencia del episodio, la hipertensión arterial y el tabaquismo

El fenotipo HLA no parece aportar predisposición para el desarrollo temprano de infarto de miocardio, y el aumento de la mortalidad por esta causa con la edad depende de otros factores de riesgo, como por ejemplo la historia materna y paterna de enfermedad cardiovascular²¹.

Para la hipertensión arterial se han identificado varios genes candidatos en los cromosomas 2q, 6q, 5q y 9q²². Otros autores han encontrado altas frecuencias para los antígenos B35, DR4 y DR7 en hipertensos caucásicos²³⁻²⁶, y para el DRB1*03 en afro-americanos, así como de genes MHC clase III²⁶. Este estudio no encontró asociación con ningún antígeno de susceptibilidad, aunque sería útil incorporar un mayor número de pacientes hipertensos para llegar a un criterio definitivo, considerando la cantidad de antígenos HLA presentes en nuestra población¹⁵.

Un estudio molecular detectó en caucásicos el primer polimorfismo MHC asociado con el tabaquismo, que incluye a 2 genes del sistema de complemento y al gen del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estos aparecen ligados al haplotipo HLA A1-B8-DR3, el cual posee una baja frecuencia en la población sana y un incremento en las enfermedades autoinmunes asociadas al HLA^{27,28}. En este estudio, a pesar de encontrar OR significativamente elevados para el B8 y para el haplotipo B8-DR3, no puede afirmarse o negarse una asociación HLA debido al reducido número de pacientes fumadores que encontramos con este fenotipo (12%).

Relación de los antígenos HLA-DR4 y B8 con el número de infartos y la historia familiar de cardiopatía isquémica

Hasta donde sabemos, no existen comunicados previos que relacionen el número de infartos con el

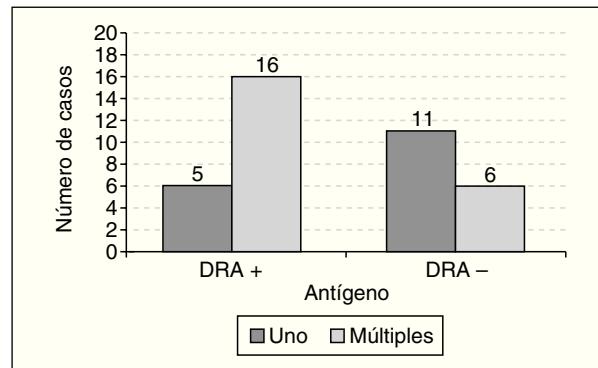


Figura 1. Relación del antígeno HLA-DR4 con el número de infartos de miocardio ($p = 0,0025$).

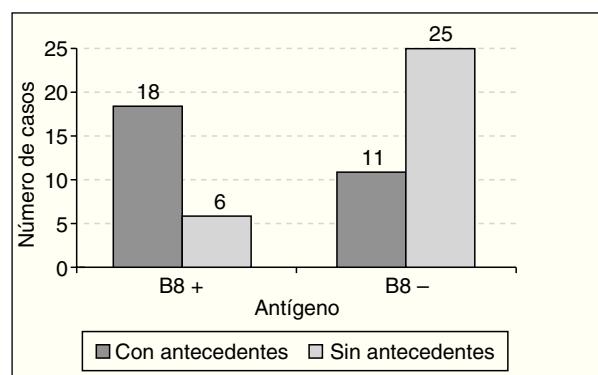


Figura 2. Relación del antígeno HLA-B8 con los antecedentes familiares de cardiopatía isquémica ($p = 0,004$).

sistema HLA. Nosotros encontramos que el 76,1% de los pacientes con fenotipo DR4 experimentaron múltiples infartos, y es posible que esta molécula posea una mayor restricción para péptidos “aterogénicos” de gran afinidad capaces de inducir una respuesta inflamatoria.

Está demostrado que la historia familiar de CI tiene una prevalencia de 2 a 5 veces mayor entre los individuos con cardiopatías que entre los sujetos normales²⁹, y que el riesgo aumenta cuando el accidente ha ocurrido en un familiar de primer grado²¹. En este estudio, cerca del 50% de los pacientes B8 positivos refirieron este antecedente, lo

cual apoya la hipótesis acerca del efecto de determinados genes individuales como portadores de predisposición para el desarrollo de la enfermedad coronaria. Entre ellos pudiera incluirse el antígeno B8, si se considera su baja frecuencia en la población normal y su relación con los procesos inflamatorios de carácter autoinmune.

Relación de la enfermedad coronaria con la autoinmunidad

Las observaciones que apoyan el vínculo entre inmunidad y aterosclerosis provienen de estudios epidemiológicos en pacientes con trastornos autoinmunes. Se ha encontrado la ocurrencia de mutaciones en genes no propios de la respuesta inmune pero que están en desequilibrio de ligamiento con alelos MHC-II (DR y DP), así como la presencia de autoanticuerpos anticardíacos asociados al antígeno DR4³⁰⁻³³.

Se conoce que el TNF- α , cuyo gen está ubicado en la región MHC clase III, puede ser sintetizado por los cardiomiositos y macrófagos del miocardio en respuesta a una lesión, y se demuestra su presencia en el 88% de las lesiones ateroscleróticas y su ausencia en el miocardio normal³⁴. El alelo TNF-A1 se ha asociado con el haplotipo A1-B8-DR3, para una elevada producción de TNF- α ^{35,36}.

En este estudio, la presencia de los antígenos DR4 y B8 y de los haplotipos B8-DR3 y B8-DR4 nos hace sugerir que el fenómeno autoinmune pudiera estar presente en la enfermedad coronaria como un proceso subyacente. Es posible que la susceptibilidad aportada por moléculas HLA particulares esté dada por la conformación de sus epítopos y el grado de afinidad para la unión con la célula T, durante la presentación de péptidos antigenicos, que provoquen estados de autoinmunidad. El TNF- α , al favorecer la expresión exagerada de moléculas MHC-II incrementaría esta respuesta, que ya ha sido observada en enfermedades crónicas, y es posible que en estas patologías los procesos autoinmunes se desarrollen paulatinamente y a largo plazo.

Para llegar a resultados concluyentes sobre la posible susceptibilidad de los genes MHC para la enfermedad coronaria, sería útil realizar estudios genéticos moleculares que permitan reforzar o anular este criterio.

Bibliografía

1. Klein J, Sato A. The HLA System. Second of two parts. N Engl J Med. 2000;14:782-86.
2. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999;40:115-26.
3. Zee RYI, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Ridker PM. Multi locus candidate genes polymorphism and risk of myocardial infarction: a population-based, prospective genetic analysis. J Thromb Haemost. 2006;4:341-8.
4. Walter DH, Zeiher AM. Genetic risk factors for myocardial infarct. Herz. 2000;25:7-14.
5. Navarro-López F. Bases genéticas de la enfermedad coronaria. Rev Esp Cardiología. 2002;55:413-31.
6. Rivero de la Calle M. Antropología de la población adulta cubana. Ciudad de La Habana: Editorial Científico Técnica; 1984. p. 44.
7. Ray JG. NIAID Manual for Typing Techniques, 1979-80. Bethesda: NIH Publications; 1979;80:39-41.
8. Bruning JW, Claas FHJ, Kardol MJ, et al. Automated reading of HLA-A, -B, -C and -DR typing and screening. En: Kanok MS, Sugasaki T, Torisu M, editors. Cellular, molecular and genetic approaches to immunodiagnosis and immunotherapy. Tokyo: University of Tokyo Press; 1987. p. 171-4.
9. Bruning JW, Douglas R, Scholtus M, Van Rood JJ. Automatic reading and recording of the microlymphocytotoxicity test. Tissue Antigen. 1972;2:473-7.
10. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest. 1968;21 Suppl 97:77-9.
11. Danilos J, Terasaki PI, Parks MS, Ayoub G. B lymphocyte isolation by thombin-nylon wool. En: Terasaki PI, editor. Histocompatibility Testing 1980. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory; 1980. p. 287-9.
12. ARLEQUIN Software Ver 1.1, L. Excoffier 2000/Geneva University/Anthropology Unit.
13. Tiwaki JL, Terasaki PI. Data and statistical analysis. En: Tiwari JL, Terasaki PI, editors. HLA and disease associations. New York: Springer-Verlag New York Inc.; 1985.
14. Excoffier L, Slatkin M. Maximum-Likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. Mol Biol Evol. 1995;12:921-7.
15. Paradoa M, Middleton D, Acosta A. Genes HLA en una muestra de la población cubana. VacciMonitor. 2000;9:3.
16. Logan RL, Oliver MF, McTavish J, Darg C, White AG. Histocompatibility antigens and myocardial infarction. Tissue Antigens. 1977;10:361-3.
17. Acton TR, Rodney CP, Roseman JM. Genetic and cardiovascular disease. Ethnicity & Disease. 2004;14:S2-16.
18. Shankarkumar U, Pitchappan R, Pethaperumal S. Human leukocyte antigens in hypertrophic cardiomyopathy patients in South India. Asian Cardiovasc Thorac Ann. 2004;12:107-10.
19. Numano F, Kishi Y, Tanaka A, Ohkawara M, Kakuta T, Kobayashi Y. Inflammation and atherosclerosis. Atherosclerotic lesions in Takayasu arteritis. Ann N Y Acad Sci. 2000;902:65-76.
20. Hansson GJ. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. N Engl J Med. 2005;352:1685-95.
21. Sesso HD, Lee I-Min, Gaziano M, Rexrode KM, Glynn RJ, Buring JE. Maternal and paternal history of myocardial infarction and risk of cardiovascular disease in men and women. Circulation. 2001;104:393-8.
22. Caulfield M, Munroe P, Pembroke J, Samani N, Dominiczak A, Brown M, et al. Genome-wide mapping of human loci for essential hypertension. Lancet. 2003;361:2118-23.
23. Diamantopoulos EJ, Andreidis EA, Vassilopoulos CV, Vlachonikolis IG, Tarassi KE, Chatzis NA, et al. HLA phenotypes as promoters of cardiovascular remodelling in subjects with arterial hypertension. J Hum Hypertens. 2003;17:63-8.
24. Sengar DPS, Couture RA, Jindal SL, Catching JD. Histocompatibility antigens in essential hypertension and myocardial infarction. Tissue Antigens. 1985;26:168-71.
25. Gerbase de Lima M, Ladalardo MA, De Lima JJ, Silva HB, Bellotti G, Pileggi F. Essential hypertension and histocompatibility antigens. An association study. Hypertension. 1992;19:400-2.
26. Acton RT, Bell DS, Go RC, Roseman J, Tseng ML, Lour W. Association of HLA phenotypes with hypertension in African Americans and Caucasoid Americans with type II diabetes, a population at risk for renal disease. Transplant Proc. 1993;25:2400-3.
27. Fusr G, Arason GJ, Kramer J, Szalai C, Duba J, Yang Y, et al. Genetic basis of tobacco smoking: strong association of a specific major histocompatibility complex haplotype on chromosome 6 with smoking behavior. Int Immunol. 2004;16:1507-14.

28. Vatay A, Yang Y, Chung EK, Zhou B, Blanchong CA, Kovacs M, et al. Relationship between complement components C4A and C4B diversities and two TNF- α promoter polymorphisms in two healthy Caucasian populations. *Hum Immunol.* 2003;64:543.
29. Lloyd-Jones DM, Nam BH, D'Agostino RB, Levy D, Murabito JM, Wang TJ, et al. Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *JAMA.* 2004;291:2204-11.
30. Sherer Y, Shoenfeld Y. Mechanism of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nature Clinical Practice Rheumatology.* 2006; 2:99-106.
31. Wojnicz R, Nowalany-Koziecka E, Wojciechowska C, Glanowska G, Wilczewski P, Niklewski T, et al. Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. *Circulation.* 2001; 104:39-5.
32. Lin W, Li WM, Yang SS, Gas C, Li SJ, Li Y, et al. Association of HLA class II DRB1, DPA1 and DPB1 polymorphism with susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy in Chinese Han nationality. *Autoimmunity.* 2006;39:461-7.
33. Hjalmarson AM, Mobini R. Who are the enemies? Inflammation and autoimmune mechanisms. *Eur Heart J Supplements.* 2002;4 Suppl G:G27-32.
34. Iachini FB, Gallina S, De Caterina R. Tumor necrosis factor α and cardiovascular disease. *Ital Herat J.* 2001;2:408-17.
35. Wilson AG, De Vries N, Pociot F, et al. An allelic polymorphism within the human TNF- α promoter region is strongly associated with HLA-A1, B8, DR3 alleles. *J Exp Med.* 1993;177: 557-60.
36. Elahi MM, Matata BM. Genetic diversity of tumour necrosis factor of cardiovascular complications of polymorphism at position 308 in the promoter region. *Cardiology.* 2005;1:179-88.