

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

Jordi Camps Andreu, Doctor en Biologia, Especialista en Bioquímica Clínica,
Professor Associat del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la FMCS
de la URV, Adjunt dels Laboratoris Clínics de l'Hospital Universitari de Sant Joan,
i Responsable del Centre de Recerca Biomèdica,

CERTIFICA QUE:

La Tesi Doctoral titulada "*Proteïna C-reactiva. Estudis en poblacions de l'àrea mediterrània*", presentada per Núria Bertran Ferrús, ha estat realitzada sota la meva direcció, i compleix els requeriments necessaris per optar al títol de Doctor.

Per a que així consti, i tingui els efectes oportuns, signo aquest certificat.

Reus, 19 de maig de 2006.



Dr. Jordi Camps Andreu

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Proteïna C-reactiva.

Estudis en poblacions

de l'àrea mediterrània

Tesi doctoral presentada per M. Núria Bertran Ferrús per
optar al grau de Doctora

Reus, maig de 2006

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

*“Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.*

*Caminante, no hay camino
sino estelas en la mar”.*

Antonio Machado

A la meva germana Rosa M^a

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

Agraïments

En primer lloc al meu Director de Tesi, Dr. Jordi Camps i Andreu. Vull agrair-li la seva confiança i constància en la meva il·lusió, i el seu suport en tot moment en la realització de la Tesi. Moltes gràcies, Jordi. Gràcies per ser sempre un referent proper en el món de la ciència que ens aplega en un medi d'atenció mèdica i docent.

Al Dr. J. Joven, Director dels Laboratoris Clínics de l'Hospital Universitari de Sant Joan de Reus, que sempre ens ha mantingut atens al món de la recerca.

A la Dra. Isabel Pujol per l'ajut com a professora de la Facultat de Medicina de la URV.

Al Dr. Josep M^a Simó, amb qui he compartit una llarga trajectòria professional, on no ha faltat mai ambició per aconseguir una acurada assistència i portar endavant una recerca clínica aplicada. El compromís del dia a dia s'agraeix i és un estímul per a millorar.

Al Dr. Joan Fernández, professor titular de Medicina Preventiva i Salut Pública de la URV, a la Dra. Victòria Arija, professora titular de la URV, i a la Dra. Michelle Murphy, professora també de la URV, per ser part fonamental en l'obtenció de mostres de la població de l'àrea mediterrània del primer i segon estudi, així com per l'ajut en la valoració dels estudis de nutrició.

A Judit Marsillach i a l'equip de professionals d'Anatomia Patològica de l'Hospital pel seu ajut en la preparació de mostres i dades de la població del tercer estudi.

A Mercè Badia i Ricard Forns, per col·laborar amb la cessió de reactius Biokit S.A. per a la determinació de PCR.

A a la La Comissió Interministerial de Ciència i Tecnologia (CICYT 89-0388) i a l'Institut de Salut Carlos III. Han col·laborat en el finançament de l'estudi (RCMN C03/089, FIS 00/0250, FIS 03/0430).

A Judith Rodríguez, tècnica de normalització lingüística pel seu assessorament.

A l'Alberto Amejide per les seves explicacions "estadístiques".

A cada una de les persones amb les quals he compartit al llarg de "bastants anys" la meua vida professional al Laboratori: no es pot resumir però sí recordar tot el que un rep, dia rere dia.

Al meus estimats: mamà, sempre plena de vida i confiança en el futur, Rosa M^a, Rafael, Miquel, Candy, Francisco- Ramon, Montse, Juan-José, Glòria, Manuel, Miquel, Maite, Júlia, Marina, Laura, Joan, Sara, son l'estímul de la meua vida.

A cada una de les persones que amb la seva amistat incondicional han donat suport a la il·lusió que portava dins.

A tot ells, moltes gràcies.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

ÍNDEX

1. Justificació	Pàg. 13
2. Introducció	Pàg. 17
2.1. Característiques de la molècula de PCR	
2.1.1. La molècula	
2.1.2. Filogènia	
2.1.3. Característiques funcionals	
2.1.4. Gens i expressió gènica	
2.2. PCR i fisiopatologia de la inflamació i l'arteriosclerosi	
2.2.1. PCR: síntesi i catabolisme	
2.2.2. PCR. Procés inflamatori i immunitat innata	
2.2.3. Paret vascular i endoteli	
2.3. Mètodes per la determinació de PCR. Aplicacions en Medicina Preventiva	
2.3.1. PCR d'alta sensibilitat	
2.3.2. PCR i factors de risc de la malaltia cardiovascular	
2.3.3. PCR i protocols actuals en medicina cardiovascular	
3. Hipòtesi i objectius	Pàg. 41
4. Participants i mètodes	Pàg. 45
4.1. Participants	
4.2. Materials i mètodes analítics	
4.3. Mètodes estadístics	
5. Articles	Pàg. 51
5.1. Article 1. Evaluation of a high-sensitivity turbidimetric immunoassay for serum C-reactive protein: application to the study of longitudinal changes throughout normal pregnancy. <i>Clin Chem Lab Med. 2005;43:308-313</i>	
5.2. Article 2. Diet and lifestyle are associated with serum C-reactive protein concentrations in a population-based study. <i>J Lab Clin Med. 2005;145:41-46</i>	
5.3. Article 3. The role of circulating monocyte chemoattractant protein-1 as a marker of hepatic inflammation in patients with chronic liver disease. <i>Clin Biochem. 2005;38:1138-1140</i>	
6. Discussió general	Pàg. 75
7. Conclusions	Pàg. 79
8. Bibliografia	Pàg. 83
9. Annex	Pàg. 93

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

1. JUSTIFICACIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

A les societats occidentals, les malalties cardiovasculars estan associades amb una mortalitat elevada que desencadena una pràctica clínica intensa als hospitals i centres d'assistència primària. Aquesta situació ha obligat a establir criteris de risc per tal de fer practicable l'atenció al pacient i evitar un desenllaç no desitjat.

L'estudi d'aquestes malalties va portar a considerar la inflamació com un dels factors relacionat amb l'etiopatogènia de l'arteriosclerosi. Durant la dècada dels 90 es va confirmar que els pacients que havien desenvolupat malalties cardiovasculars presentaven una resposta inflamatòria que estava fortament augmentada.

La recerca en el camp de la Bioquímica Clínica ha aportat diversos marcadors suficientment útils per a l'estudi dels processos inflamatoris i/o l'arteriosclerosi.

La proteïna C-reactiva (PCR), coneguda ja des de anys 30 i emprada des dels anys 80 pel diagnòstic d'infeccions, ha estat un dels marcadors estudiats.

Diversos autors han fet estudis comparatius en diferents moments de la malaltia i també en la població sana. La resposta de cada grup de població, ja sigui per edat, sexe, hàbits, és fonamental per afinar en establir els valors de referència adients i en conèixer també les limitacions de la seva interpretació. De manera paral·lela, la tecnologia ha fet possible el desenvolupament de mètodes prou sensibles i específics.

Aquesta Tesi Doctoral vol ser una aproximació al món de la clínica, un pont entre la recerca aplicada i una visió que aposta per la prevenció com la millor forma d'assistència.

Contribuir a la familiarització del paràmetre PCR en la pràctica clínica, per aconseguir una millor prevenció dels procés arterioscleròtic i/o malaltia cardiovascular és l'objectiu que aquesta Tesi Doctoral persegueix.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

2. INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

2.1. CARACTERÍSTIQUES DE LA MOLÈCULA DE PCR

2.1.1. LA MOLÈCULA

La Proteïna C-reactiva (PCR) va ser descoberta per Tillet i Francis (1930) en el sèrum de pacients amb pneumònia per pneumococ. Va ser anomenada així perquè precipitava la fracció del polisacàridC del pneumococ. ⁽¹⁾

Uns anys més tard, Mc Leod i Avery (1941) van descriure l'aïllament i propietats de la PCR i van introduir l'expressió "fase aguda" per caracteritzar el sèrum de pacients amb malalties infeccioses agudes. ⁽²⁾

La PCR forma part de la família de les pentraxines de les proteïnes plasmàtiques, de la superfamília de les lectina-proteïnes que posseeixen el plegament característic de la lectina i tenen llocs d'unió amb lligands dependents del calci. ^(3, 4)

La família de les pentraxines inclou en humans dues classes de proteïnes, la PCR i les proteïnes amiloides sèriques (PAS).

El nom de pentraxines (del grec penta i ragos) els ha estat donat per la seva estructura pentamèrica, anular, de simetria cíclica. ^(5, 6)

La molècula de PCR humana (M: 115 135) està formada per 5 unitats idèntiques de polipèptids no glucosilats (M: 23027) i cada un dels polipèptids té 206 residus d'aminoàcids. (Figura 1)

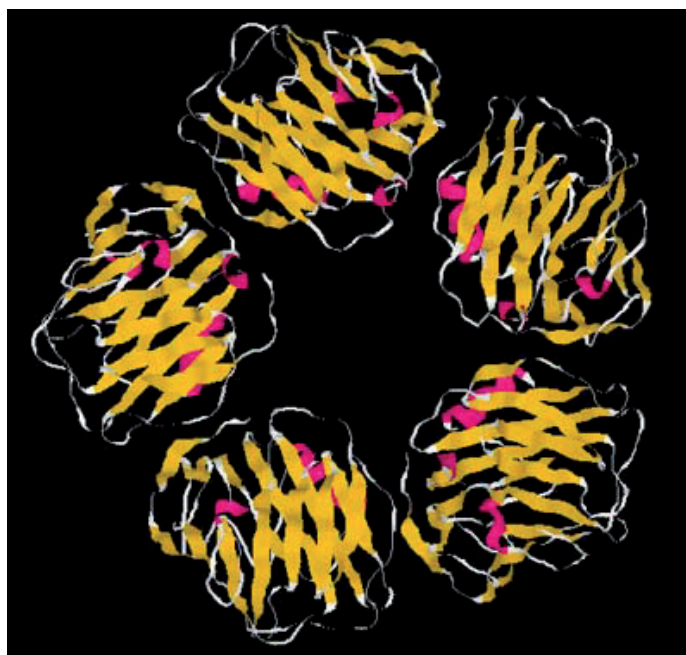


Figura 1. La molècula de PCR. Estructura quaternària: simetria cíclica C5. Diagrama de cintes, observat en proteïna cristal·litzada. Adaptat de www.focus.hms.edu/2002/
Imatge adaptada de l'original per Paul Ridker.

Per cristal·lografia s'ha pogut confirmar que els residus d'aminoàcids de la zona de reconeixement i unió amb el lligand pel qual té més afinitat, com és la fosforilcolina, són Ph66 i Glu88 a la cara B de la molècula. (7,8,9)

També per cristal·lografia s'ha demostrat que la proteïna C1q del complement s'uneix a la cara A del protòmer i que els residus Asp112 i Tyr175 són importants per a la unió amb el C1q; que la Glu88 indueix un canvi conformacional en C1q, necessari per a l'activació del complement, i que l'Asn158 i His38 probablement contribueixen a la correcta geometria del lloc d'unió. (10)

2.1.2. FILOGÈNIA

La PCR està altament conservada en l'evolució. Té proteïnes homòlogues en els vertebrats així com en animals tan separats filogenèticament com els artròpods: la seva estructura i funció és similar a la d'una proteïna que, en elevada concentració, s'ha trobat en el *Limulus polyphemus*, un "fòssil vivent".(11, 12, 13) Cal destacar que no sempre la funció està conservada totalment. Per exemple, en murins, la principal proteïna de fase aguda és la proteïna amiloide sèrica A, mentre que la concentració plasmàtica de PCR quasi no es modifica, just al revés dels éssers humans. (14, 15)

Tot i que la seva seqüència d'aminoàcids és molt similar en diverses espècies, hi ha també moltes diferències pel que fa a estructura i funció, com són la glicosilació, la capacitat per activar el complement autòleg, així com la regulació de la seva síntesi. Això fa que calgui tenir cura en extrapolar resultats de models animals a humans. (11)

Una de les funcions que presenten les pentraxines en humans és l'opsonització, acció que també poden provocar les immunoglobulines o el complement. (16) En espècies de peixos hi ha proteïnes similars a les pentraxines amb una gran capacitat d'activitat d'opsonització. Aquestes han estat punts de partida per estudiar el fenomen de la opsonització. (17)

2.1.3. CARACTERÍSTIQUES FUNCIONALS

La PCR humana és una proteïna amb un lloc d'unió a lligands que és dependent del calci. Té una gran afinitat per residus de la fosfocolina, però també en té amb una gran varietat d'altres lligands autòlegs i extrínsecs. (11,18)

Els lligands autòlegs inclouen lipoproteïnes plasmàtiques nadiues i modificades (19), membranes de cèl·lules lesionades (20), un nombre de diferents fosfolípids i compostos relacionats, partícules de ribonucleoproteïnes nuclears petites (21,22) i cèl·lules en apoptosi. (23)

Els lligands extrínsecs inclouen la majoria de glicans, fosfolípids i altres components de bacteris, fongs i paràsits de la mateixa manera que productes vegetals. (24, 25)

Quan la PCR està unida a un lligand, és reconeguda per C1q, del sistema del complement, i indueix l'activació del complement per la via clàssica; això genera C3b, porta a la deposició d'opsonines sobre el patogen i afavoreix la fagocitosi.

La segona funció de la PCR està relacionada amb la capacitat de participar com un anticòs i per tant de contribuir a la defensa davant de la infecció: després de la seva interacció amb el patogen, és reconeguda pel receptor per la Fc de la IgG(RFc), receptors expressats en macròfags i granulocits neutròfils. (11, 26)

La conservació de l'estructura de la PCR juntament amb el desconeixement de l'existència de persones amb dèficit d'aquesta proteïna o amb polimorfismes del seu gen suggereix que la PCR té valor de "supervivència". (11)

La infecció bacteriana és un element molt important durant la selecció natural i la PCR té moltes característiques per tenir un paper important en la immunitat innata que discrimina allò que es propi d'allò que és estrany. (11, 26)

2.1.4. GENS I EXPRESSIÓ GÈNICA

Els gens de la PCR són al cromosoma 1 (Figura 2), en el braç llarg i en posició proximal (entre la banda q12 i la banda q23). El gen consisteix en 2 exons separats per un intron de 278 pb. El primer exó codifica un pèptid líder o inicial i els dos primers aminoàcids de la proteïna madura, i el segon exó codifica els restants 204 aminoàcids. (27, 28) Un pseudogen no funcional amb el 50-80% de la regió específica homòloga és al final de l'autèntic gen de la PCR i les seqüències del pèptid promotor estan localitzades al començament de la regió (104 nucleòtids pel començament del pèptid senyal). (11)

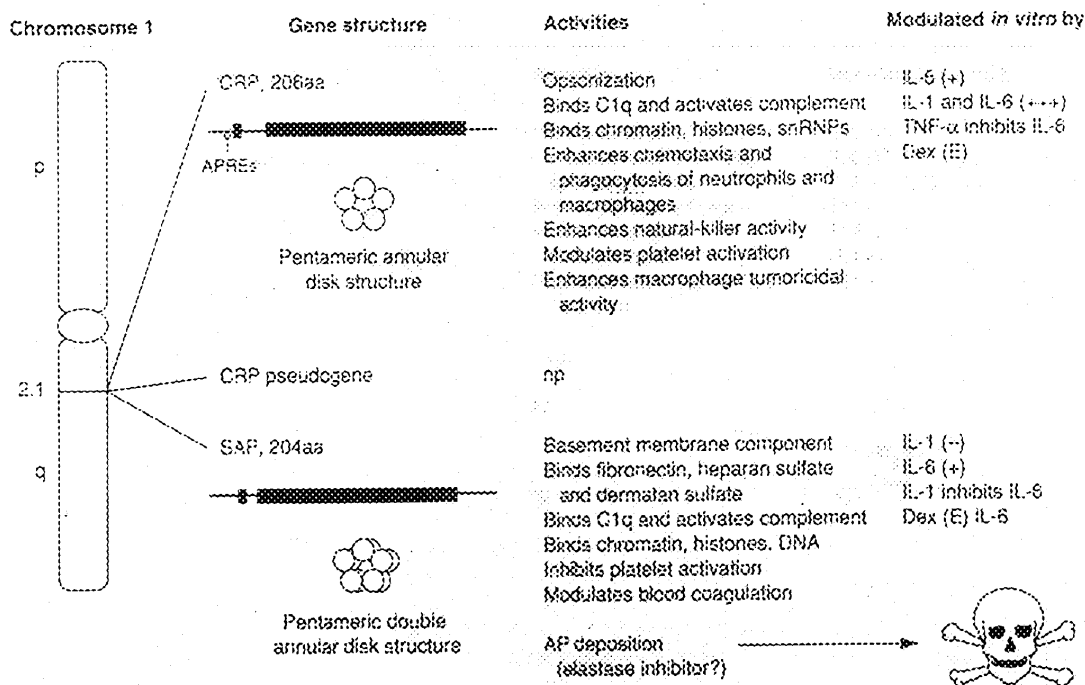


Figura 2. Posició del gen de la PCR i de la PAS en el cromosoma 1. Comparació entre les activitats de la PCR i la PAS. Adaptat de www.chem.uwec.edu/Chem406_F97/Webpages97.

FUNCIONS PCR:

- Unió a C1q i activació del complement
- Unió a la cromatina, histones, snRNPs
- Col·labora en la quimiotaxi i fagocitosi de macròfags i neutròfils
- Col·labora en l'activitat de *natural killer*
- Modula l'activació de les plaquetes
- Col·labora en activitat dels macròfags en tumors

FUNCIONS DE PAS:

- Component de la membrana basal
- S'uneix a la fibronectina, heparan sulfat i dermatan sulfat
- S'uneix al C1q i activa el complement
- S'uneix a la cromatina, histones DNA
- Inhibeix l'activació de les plaquetes
- Modula la coagulació de la sang

La PCR és produïda als hepatòcits ⁽²⁹⁾, tot i que altres llocs de síntesi han estat suggerits. ^(30,31,32,33,34) Els increments de producció són deguts principalment a la Interleuquina-6 (IL-6), tot i que n'intervenien d'altres com la Interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosi tumoral α (*tumour necrosis factor α* , *TNF- α*). ⁽³⁵⁾ El control de l'expressió gènica és sobretot a nivell de transcripció i, *in vitro*, els estudis en línies cel·lulars d'hepatòcits han identificat el senyal intracel·lular corresponent. ^(36, 37) També s'ha demostrat que la seva secreció és més eficient durant una resposta fase aguda. ^(18, 38)

2.2. PCR I FISIOPATOLOGIA DE LA INFLAMACIÓ I L'ARTERIOSCLEROSI

2.2.1. PCR: SÍNTESI I CATABOLISME

La PCR es produïda als hepatòcits ⁽²⁹⁾ tot i que s'han suggerit altres llocs de síntesi ^(30, 31, 32, 33, 34). Pot tenir un efecte tan local com sistèmic. ⁽¹¹⁾

Kushner i Feldman ⁽³⁹⁾ van localitzar la PCR als hepatòcits adjacents a l'àrea portal unes hores després de l'estímul inflamatori. Aquesta observació estava d'acord amb el concepte de mediadors de la resposta de fase aguda. Aquests mediadors són citocines solubles produïdes principalment per monòcits/macròfags però també per altres leucòcits o cèl·lules endotelials. Les citocines més directament implicades són la IL-6, IL-1 β i el Factor de Necrosi Tumoral α (TNF- α). ^(18, 26, 35)

Tots el individus tenen capacitat per produir PCR. No hi ha cap referència a la literatura sobre el seu dèficit. La vida mitjana en plasma és de 19 hores. La proteïna no passa la barrera de la placenta i és sintetitzada pel fetus i el nounat. ^(18, 40)

La concentració de PCR en plasma és molt variable segons l'edat i l'estil de vida (*Taula 1*) i la presència o no de patologia. La mitjana en voluntaris sans és inferior a 1 mg/L mesurada amb mètodes d'alta sensibilitat. Un fet important és que els valors poden augmentar fins a 1.000 vegades i que en un sol estímul el màxim arriba a les 48 hores i a les 4-6 hores es poden trobar ja valors elevats. En totes les patologies el determinant és la velocitat de producció. ⁽¹⁸⁾

En estudis animals l'únic lloc de catabolisme sembla l'hepatòcit.

La fallida hepàtica pot donar una disminució de la producció de PCR, però no altres patologies intercurrents. Tampoc s'han descrit fàrmacs que disminueixin la seva producció, a menys que estiguin involucrats en el mateix fonament de l'estímul.

Tot i que el seu paper *in vivo* no està completament establert ^(18, 41), les seves propietats la relacionen amb un paper fonamental en el mecanisme de defensa no específic, en resposta a una lesió postraumàtica o postquirúrgica als teixits, i en situacions inflamatòries agudes. També s'ha descrit que, en algunes situacions cròniques com neoplàsies, poden haver-hi increments persistents. ^(11, 18)

És, doncs, un sensible però no específic marcador de la inflamació i les seves concentracions en plasma han de ser interpretades en el context de la història clínica.

VARIABLES PREANALÍTQUES FISIOLÒGIQUES
• Raça
• Edat
• Sexe
• Estació de l'any
• Variació biològica
• Estil de vida: exercici, obesitat, alcohol, teràpia hormonal, fàrmacs antiinflamatoris
• D'altres: embaràs

Taula 1. Variables preanalítiques conegudes que afecten valors de PCR en plasma. ⁽¹⁸⁾

2.2.2. PCR. PROCÉS INFLAMATORI I IMMUNITAT INNATA

2.2.2.1. INFLAMACIÓ I SISTEMA DEL COMPLEMENT

La inflamació consisteix en l'atracció de leucòcits i en l'extravasació de diverses proteïnes plasmàtiques en les zones d'infecció, així com l'activació d'aquests leucòcits i proteïnes per eliminar l'agent infeccios. La resposta inflamatòria vol aïllar la zona lesionada i facilitar el pas de cèl·lules i proteïnes a aquesta zona. La inflamació també pot lesionar teixits normals.

La resposta inflamatòria és un dels episodis més importants dins de l'actuació de sistema immune.

Les proteïnes del sistema del complement constitueixen els components humorals més determinants en el sistema immune en la seva vessant d'immunitat innata, que és la resposta inicial (*per evitar la infecció pel microorganisme i procurar-ne l'eliminació*).

S'ha descrit, al parlar de les funcions de la PCR, que, un cop unida a un lligand (que poden ser microorganismes, o restes cel·lulars o altres partícules) és reconeguda per la proteïna C1q del sistema complement i activa la via clàssica.

En el sistema del complement, s'han descrit almenys tres vies d'actuació denominades via clàssica, via alternativa i via de la lectina. Convergeixen en la via citolítica a través del complex d'atac a la membrana (MAC, membrane attack complex).

Les funcions bàsiques del sistema del complement són: producció d'inflamació, opsonització de microorganismes, mediació d'efectes citotòxics directes sobre diferents tipus cel·lulars i potenciació de la resposta B ^(26, 42) (Figura 3).

FUNCIONES MEDIADAS POR EL COMPLEMENTO



Figura 3. Esquema de les funcions mediades pel complement. Via clàssica, alternativa i via de les lectines. ⁽²⁶⁾ Adaptat de *Introducción a la inmunología*. Faimboim Leonardo, Geffner Jorge.

2.2.2.2. LA PCR I LA IMMUNITAT INNATA

La immunitat innata té com a funció el control del procés infecció fins a desenvolupar la resposta immune adaptativa. Comprèn, en primer lloc, barreres físiques i anatòmiques. Si aquesta barrera és superada pel microorganisme, aleshores es posen en marxa mecanismes cel·lulars i humorals.

Entre els components cel·lulars destaquen:

- neutròfils
- eosinòfils
- macròfags
- cel·lules NK
- cèl·lules dendrítiques
- mastòcits
- cèl·lules endotelials

Els mecanismes humorals impliquen

- sistema del complement
- proteïnes de fase aguda: Proteïna C- reactiva
- interferó α i β

Les cèl·lules iniciadores de la immunitat innata reconeixen uns patrons moleculars associats a patògens (PAMP) amb uns receptors de reconeixement de patrons (RRP).

També poden reconèixer els patògens de manera indirecta, sense els receptors RRP, com poden ser receptors que captin immunoglobulines (RFc) o components activats del complement.

L'activació dels receptors expressats per les cèl·lules de la immunitat innata (com són els RRP) posa en marxa diferents funcions que inclouen la fagocitosi i la producció d'un conjunt d'intermediaris inflamatoris com son intermediaris reactius de l'oxigen (IRO), lípids bioactius, quimiocines i citocines (26, 42, 43, 44) (Figura 4).

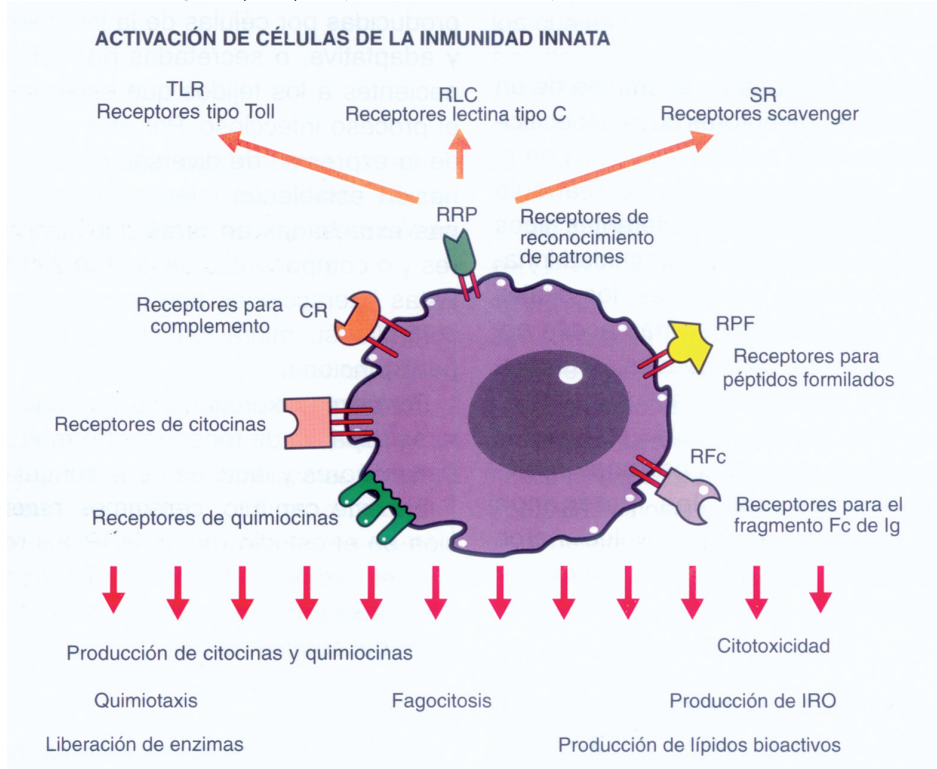


Figura 4. Mecanismes de reconeixement utilitzats per les cèl·lules de la immunitat innata. Les cèl·lules de la immunitat innata fan servir diversos RRP, que poden expressar-se en la superfície cel·lular o ser solubles (excretats als líquids corporals). (26) Adaptat de *Introducción a la inmunología*. Faimboim Leonardo, Geffner Jorge.

Receptors de reconeixement de patrons (RRP) de superfície cel·lular

- Receptors tipus Toll (TLR), importants pel reconeixement de diferents estructures de bacteris i fongs. Han estat identificats 11. La seva activació no produeix fagocitosi, fa activar la síntesi d'intermediaris inflamatoris.
- Receptors de lectina tipoC (RLC), reconeixement d'hidrats de carboni. Promou fagocitosi.
- Receptors *scavenger* (SR). Foren identificats com a receptors de lipoproteïnes modificades i per tant intervenen en el desenvolupament de l'aterogènesi. També interaccionen amb lipoproteïnes bacterianes.

Receptors de reconeixement de patrons (RRP) humerals o solubles

Estan presents en els líquids corporals i en les superfícies dels epitelis

- Proteïna d'unió a la manosa
- Ficolines H,L
- **Proteïna C- reactiva, PCR**
- Proteïnes surfactantst pulmonars, excretades en la superfície de l'epiteli respiratori.

Les dues primeres, un cop han reconegut els lligands, adquireixen la capacitat d'activar el sistema del complement per la "via de la lectina".

La PCR s'uneix amb alta afinitat a residus fosfocolina, presents en polisacàrids de virus, bacteris, fongs i paràsits. La fosfocolina s'expressa també a la membrana de les cèl·lules dels mamífers, però solament és accessible pel seu reconeixement en cèl·lules necròtiques o en apoptosi. Per tant la PCR és capaç de reconèixer no solament microorganismes sinó també cèl·lules pròpies que requereixen ser eliminades. (18, 26, 42)

2.2.2.3. PCR I SISTEMA DE COMPLEMENT

Tenim doncs que la PCR és un RRP i reconeix un lligand, i és capaç d'unir-se a la proteïna C1q e induir l'activació del complement per la via clàssica, cosa que porta a la deposició d'opsonines (C3b) sobre el patogen i afavorir la fagocitosi. No afavoreix la lisi cel·lular, donada l'activació per la via clàssica. (26)

La promoció de la fagocitosi induïda per la PCR no guarda solament relació amb la capacitat d'activar el complement, generant C3b, sinó per la particularitat de ser reconeguda per la fracció Fc de les immunoglobulines de membrana dels macròfags i granulòcits. El reconeixement de la PCR pels Rfc representa un segon mecanisme promotor de la fagocitosi.

El sistema del complement és el de més gran impacte dins de la resposta antibacteriana. És de les seves funcions més importants generar una resposta inflamatòria. Aquesta resposta inflamatòria s'acompanya per canvis en el flux sanguini local i en la permeabilitat vascular, que produeixen els signes clàssics de la inflamació descrita per Celsius fa més de doscents anys: tumor, rubor, calor i dolor. Aquests canvis permeten que els leucòcits circulants s'extravassin al lloc de la infecció, destrueixin els patògens, netegin les restes cel·lulars i comencin el procés de regeneració cel·lular.

El procés d'extravasament leucocitari en el procés inflamatori involucra l'acció coordinada de molècules d'adhesió i quimioattractants (en quatre fases: rodament o rolling, adherència estable, diapèdesi i migració) (26, 42, 43, 44) (Figura 5).

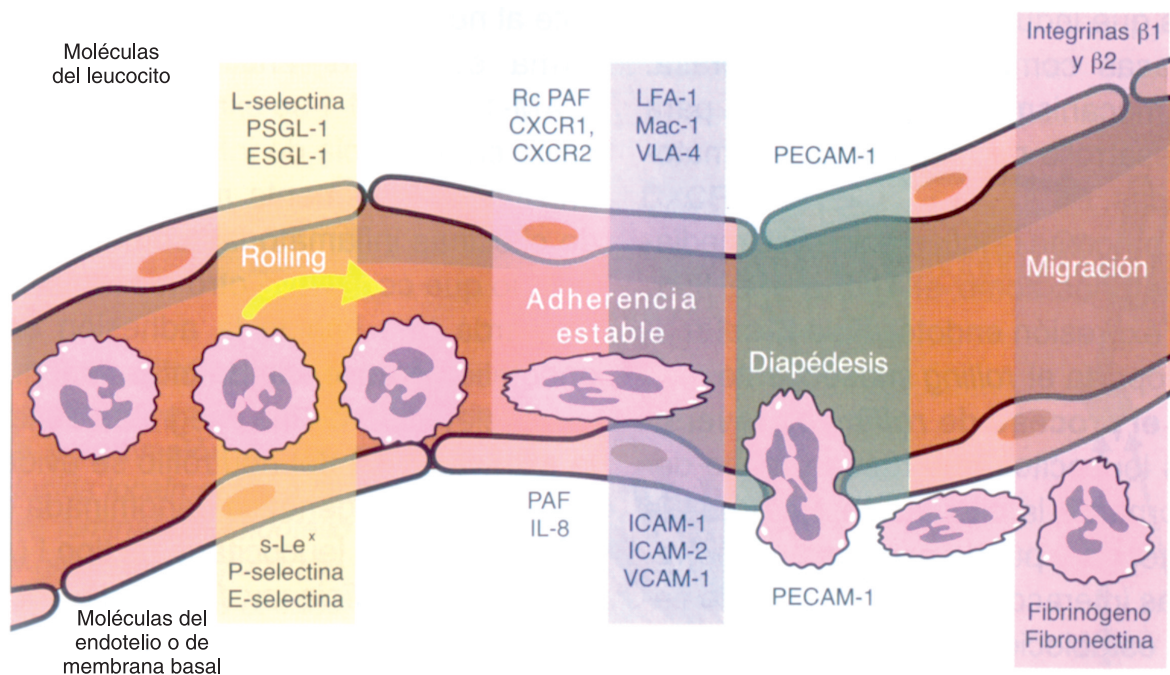


Figura 5. Procés d'extravasament leucocitari: Acció coordinada de molècules d'adhesió i quimioattractants.
 (26) Adaptat de *Introducción a la inmunología*. Faimboim Leonardo, Geffner Jorge.

2.2.2.4. IMMUNITAT INNATA I MCP-1

Com s'ha dit el procés d'extravasament leucocitari requereix l'acció combinada de molècules d'adhesió i quimioattractants. Les molècules d'adhesió constitueixen un conjunt de molècules presents en la superfície cel·lular que intervien en les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula matriu extracel·lular. Entre les molècules d'adhesió destaquen la família de les selectines expressades localment. Algunes s'expressen en la superfície dels neutròfils com la L-selectina; altres, com la E-selectina, s'expressen en forma constitutiva en cèl·lules endotelials i són induïdes per estímuls inflamatoris.

Altres molècules d'adhesió importants són les d'adhesió intercel·lular (ICAM-1, intercellular adhesion molecules) i adhesió vascular (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule). Són molècules expressades en baixes concentracions en la majoria de vasos; la seva expressió és molt més important en l'endoteli de vasos que irriguen teixits inflamats per l'acció de citocines inflammatòries expressades localment.

Els quimioattractants són substàncies que dirigeixen la migració cel·lular per un gradient de concentració que s'incrementa fins al lloc de producció (focus inflamatori). Inclou molècules tan diverses com C5a i C3a, leucotriens, factor activador de plaquetes (PAF) i una extensa família de quimiocines. Els leucòcits, després de passar la làmina basal, segueixen camins de **quimioattractants** per arribar al focus infecció. Els neutròfils són reclutats immediatament però també els monòcits segueixen el mateix camí i es transformen en macròfags i/o cèl·lules dendrítiques.

Dels quimioattractants destaquem l'extensa superfamília de les quimiocines. Són importants ja que dirigeixen el trànsit leucocitari als llocs anatòmics on realitzen la seva funció. Actuen en la funció d'angiogènesi.

De les quimiocines, citocines petites de 8-14 kDa, destaquem la proteïna quimotàctica per monòcits (MCP-1).

S'han identificat, en humans, 43 d'aquestes citocines. Algunes són sintetitzades en condicions **inflammatòries**, altres en canvi es produeixen en forma constitutiva i són responsables del trànsit limfocitari als diferents òrgans, són anomenades quimiocines **homeostàtiques**. D'altres tenen funció dual. La MCP-1 entre altres manté sempre un actiu que és incrementat per la inflamació.

Receptores de Quimiocinas	Quimiocinas		
	Nombres corrientes	Nombres sistemáticos	
CXCR1	IL-8	CXCL8	
	GCP-2	CXCL6	
	NAP-2	CXCL7	
	CXCR2	ENA78	CXCL5
		Gro- α	CXCL1
		Gro- β	CXCL2
		Gro- γ	CXCL3
CXCR3	IP-10	CXCL10	
	MIG	CXCL9	
CXCR4	I-TAC	CXCL11	
CXCR5	SDF-1	CXCL12	
CXCR6	BCA-1	CXCL13	
CCR1	RANTES	CXCL16	
	MIP-1 α	CCL5	
	MCP-3	CCL3	
	CCR2	MCP-1	CCL7
		MPC-2	CCL2
	MCP-4	CCL13	
	Eotaxin	CCL11	
	CCR3	TARC	CCL17
		MDC	CCL22
	CCR4	MIP-1 β	CCL4
	CCR5	MIP-3 α	CCL20
	CCR6	ELC	CCL19
	CCR7	SLC	CCL21
		I-309	CCL1
	CCR8	MEC	CCL28
	CCR9	CTACK	CCL27
CCR10	TECK	CCL25	
CCR11	Fractalkina / Nerotactina	CX ₃ CL1	
CX ₃ CR1	Linfotacina	XCL1	
XCR1			

Figura 6. Llistat de quimiocines i receptors. Es coneix poc com s'integren els múltiples senyals generats per les quimiocines. Aquestes arriben a la cara luminal de l'endoteli i es fixen. La seva presència i tipus determinarà la resposta del leucòcit que arriba a l'endoteli.^(26, 42) Adaptat de *Introducción a la inmunología*. Faimboim Leonardo, Geffner Jorge. *Inmunología celular i molecular*. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Jordan S.

Les quimiocines es diferencien de la resta de citocines en què exerceixen els seus efectes després d'interactuar amb receptors tipus serpentina que s'acoblen a la proteïna G. L'homologia estructural ve donada per residus de cistina que formen pont disulfur i estableixen l'estructura. Hi ha descrits 19 receptors per les 43 quimiocines. (Figura 6).

Els neutròfils són cèl·lules reclutades molt ràpidament al lloc de la inflamació. També els monòcits, que, un cop en el lloc de la inflamació, són transformats en macròfags i/o cèl·lules dendrítiques.

Els neutròfils poden destruir i fagocitar els microorganismes, sintetitzar mediadors lipídics inflamatoris i produir una gran varietat de citocines (IL-1, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α). Els macròfags poden realitzar les mateixes funcions dels neutròfils però, en resposta a citocines produïdes per ells mateixos (acció autocrina) o per altres tipus cel·lulars secreten un ampli espectre de citocines amb multitud de funcions. Destaquem les que medien la inducció d'una resposta inflamatòria aguda, local i sistèmica (IL-1, TNF- α i IL-6).

Els macròfags activats també produeixen quimiocines que juntament amb les produïdes per altres tipus cel·lulars (cèl·lules endotelials, mastòcits, neutròfils, i cèl·lules dendrítiques) participen en la reacció inflamatòria antimicrobiana, indueixen el reclutament de leucòcits en el lloc de la lesió de manera que hi multipliquen la seva presència. (Figura 7). (26, 42)

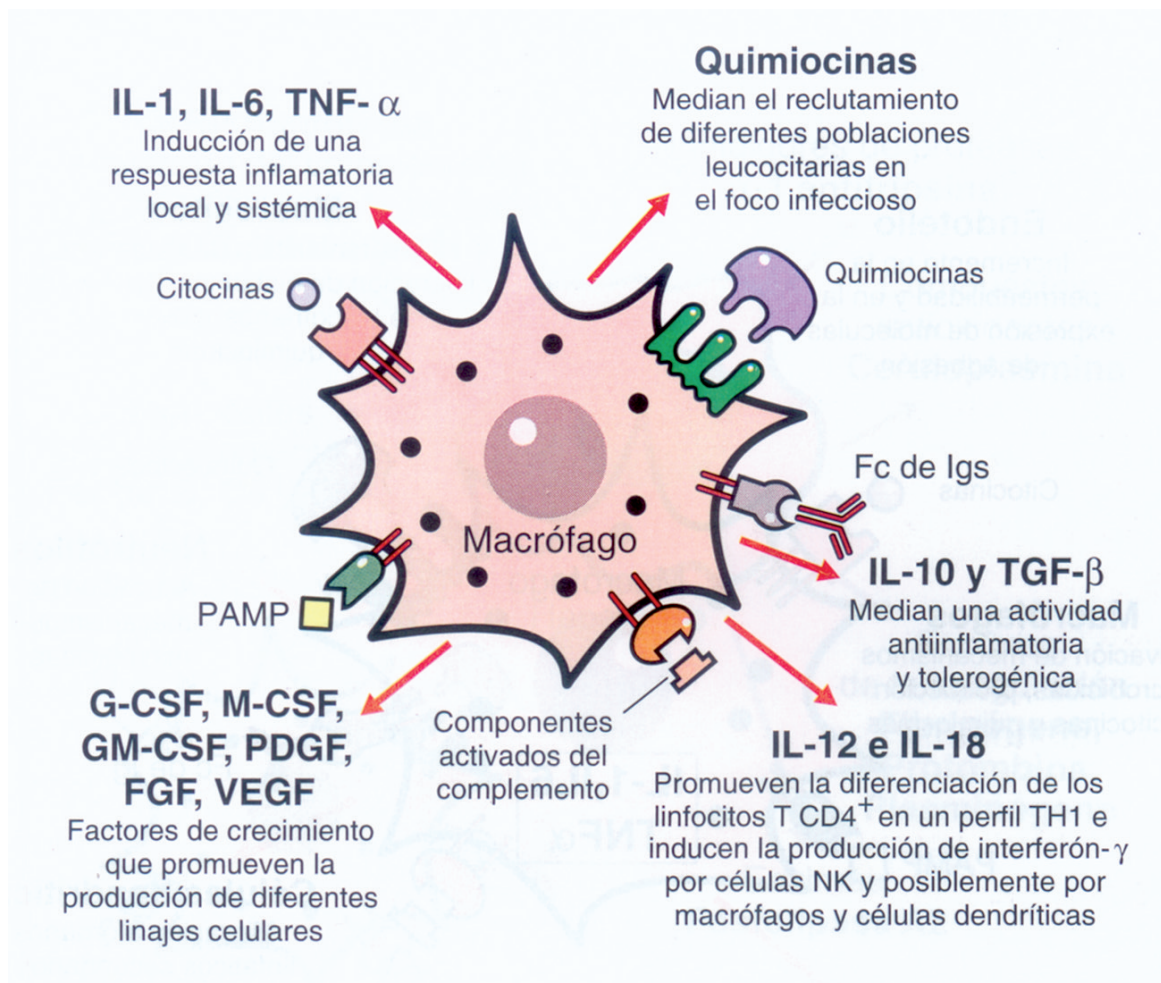


Figura 7. Producció de citocines i quimiocines per macròfags activats. (26) Adaptat de *Introducción a la inmunología*. Faimboim Leonardo, Geffner Jorge.

L'activació del complement es destaca per produir la inflamació a través d'actuar sobre neutròfils i macròfags que sintetitzen abundants intermediaris anomenats citoquines que actuen sobre diferents cèl·lules i sobre l'epiteli.

Les citocines IL-1, TNF- α , IL-6 medien la inducció d'una resposta inflamatòria aguda local i sistèmica. Al cap de poques hores d'haver-se iniciat el procés infecció, sobretot els de naturalesa bacteriana, els macròfags augmenten la producció de IL-1, TNF- α , IL-6, en resposta a la seva estimulació per PAMP, citocines o components del complement.

Aquestes tres citocines medien un conjunt d'activitats que porten a un quadre inflamatori agut local i sistèmic denominat "reacció de fase aguda" que intenta resoldre el procés infecció amb l'eliminació del seu agent causal.

- Les accions inflamatories locals medides per IL-1, TNF- α i IL-6 són exercides sobre diferents poblacions cel·lulars en l'entorn immediat del focus infecció. (Figura 8) (26)

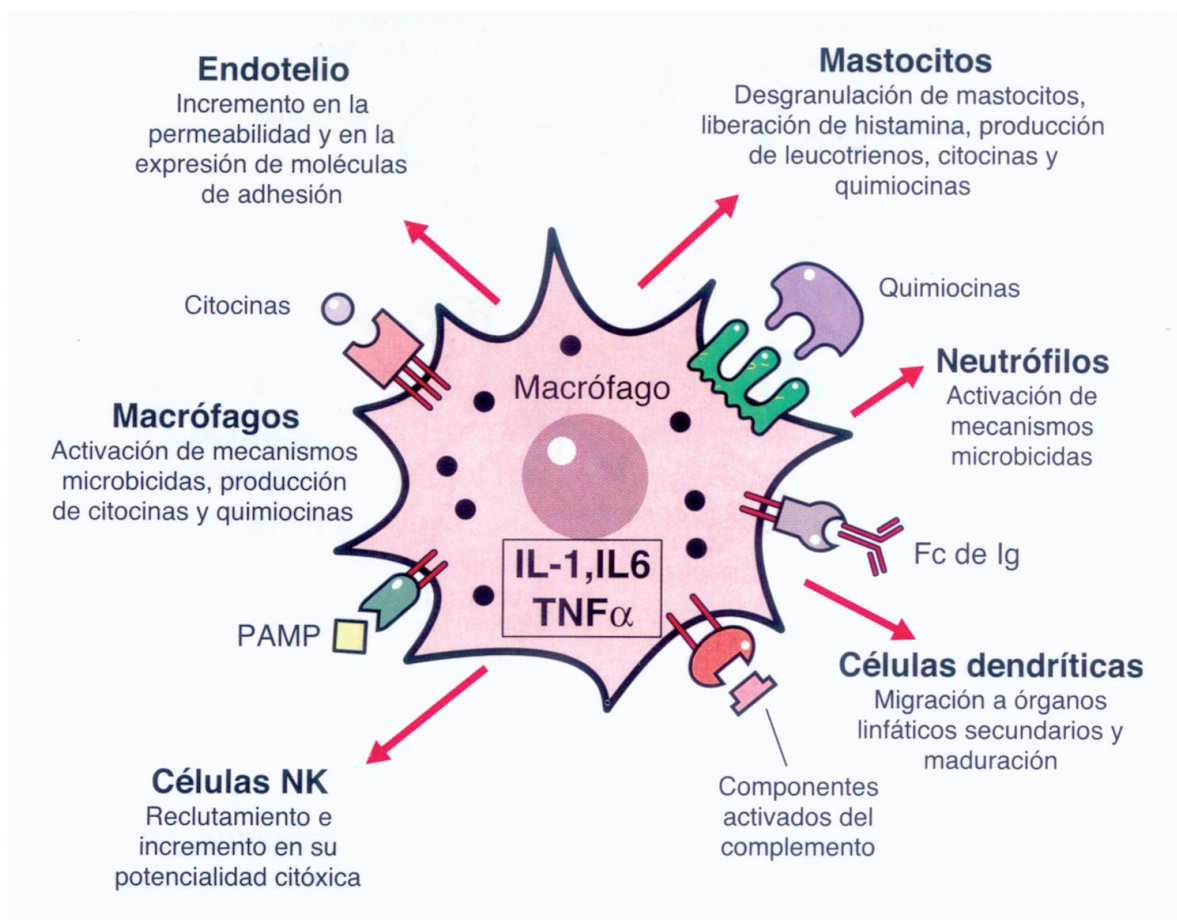


Figura 8. Accions inflamat3ries locals exercides per IL-1, TNF- α , IL-6. (26) Adaptat de Introducci3n a la immunologia. Faimboim Leonardo, Geffner Jorge.

• Les accions inflamatòries sistèmiques mediades per IL-1, TNF- α i IL-6 són exercides en tres nivells.
(Figura 9) (26)

- Hepàtic: indueixen la producció de proteïnes de fase aguda (PCR)
- Hipotalàmic: indueixen l'increment de temperatura corporal
- En el moll d'os i en el patrimoni marginal de neutròfils, indueixen neutrofilia

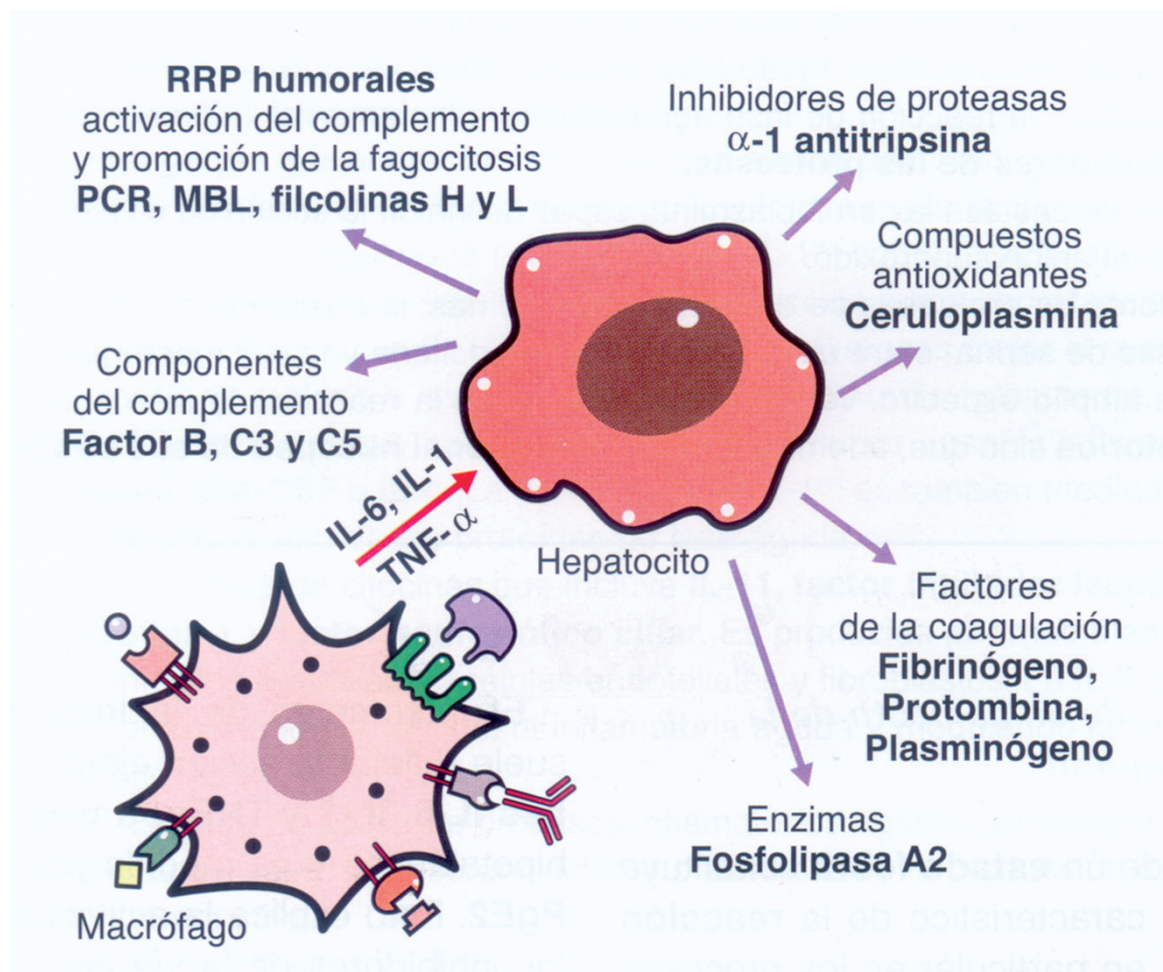


Figura 9. Proteïnes de fase aguda. (26) Adaptat de *Introducción a la inmunología*. Faimboim Leonardo, Geffner Jorge.

2.2.3. PARET VASCULAR I ENDOTELI

En tots el tipus d'artèries es poden distingir tres capes concèntriques

- L'Íntima constituïda per cèl·lules endotelials
- La mitjana, formada pel cèl·lules musculars de teixit llis
- La capa externa, adventícia, constituïda per fibroblastes i fibres de col·lagen. ⁽⁴⁴⁾ (Figura 10)

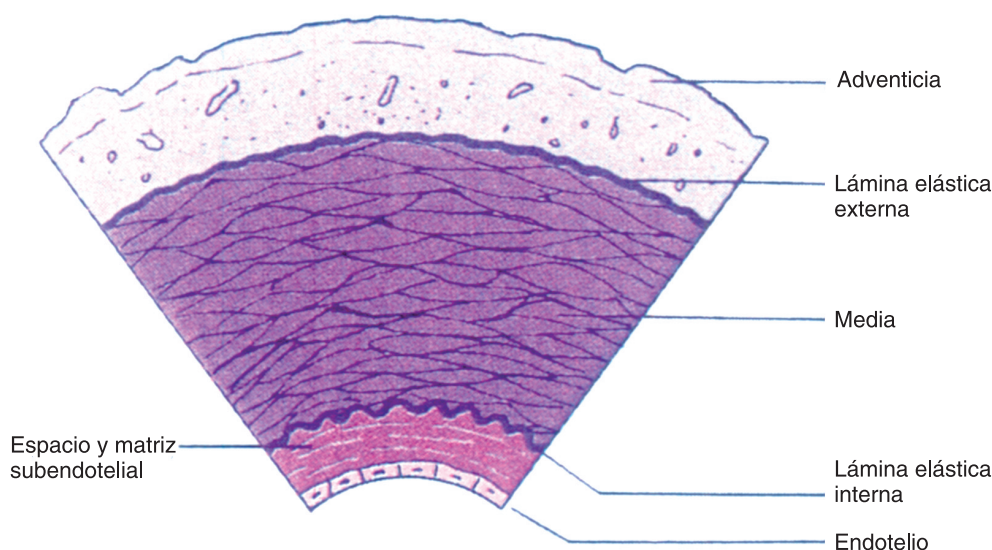


Figura 10. Estructura de la paret vascular. ⁽⁴⁴⁾ Adaptat de Tresguerres JAF. Fisiologia humana.

L'endoteli està considerat el principal òrgan de regulació vascular, que està implicat en processos vasoactius, metabòlics i immunitaris. Entre els factors biològicament actius alliberats per les cèl·lules endotelials cal destacar: la prostaciclina (PGI₂), l'òxid nítric (NO), el factor hiperpolarizant derivat de l' endoteli (EDHF), l'endotelina (ET), la prostaglandina H₂, el tromboxà A₂ (TXA₂), els heparinoides-sulfat, el factor de creixement transformat beta (TGFβ), el factor de creixement de fibroblastes bàsic (bFGF), l'activador tissular de plasminogen (t-PA), l'inhibidor de l'activador del plasminogen-1 (PAI-1), espècies reactives d'oxigen (peròxid d'hidrogen), interleucines, quimiocines, molècules d'adhesió de monocits (ICAM-1, VCAM-1, ELAM, E-selectina) i altres.

Tots aquests factors modulen el to vascular i l'estructura vascular. També l'endoteli regula l'homeostasi i la trombosi mitjançant les funcions antiplaquetàries, anticoagulants i fibrinolítics així com la inflamació a través de l'expressió de molècules quimiotàctiques i d'adhesió.

Pel que fa a la participació de forma important en els processos inflamatoris associats a la pròpia paret les cèl·lules endotelials, aquestes produeixen substàncies quimiotàctiques per als leucòcits, com el factor activador de les plaquetes (PAF), la interleucina 8 (IL-8) la proteïna quimiotàctica per monòcits (MCP-1) i altres.

Són també importants les molècules d'adhesió, produïdes per l'endoteli que medien les interaccions entre els leucòcits i la paret i que estan relacionades amb la migració d'aquests a l'espai extravascular i participen en les alteracions inflamatòries: selectines, ICAM-1, VCAM-1, PECAM (molècules d'adhesió endotelial plaquetària).

2.2.3.1. DISFUNCIÓ ENDOTELIAL

S'entén per disfunció endotelial una sèrie d'alteracions que afecten a la síntesi, a l'alliberació, a la difusió o a la degradació dels diversos factors derivats de l'endoteli. Aquestes alteracions funcionals han estat observades en situacions patològiques com l'ateriosclerosi, la hipertensió arterial, la hipercolesterolèmia i la diabetis.⁽⁴⁴⁾

L'evidència que la inflamació és un procés actiu en el desenvolupament crònic de les plaques d'ateroma és bioquímica i patològica. Tant en models animals com en fines venes d'humans, les primeres cèl·lules que apareixen a l'endoteli són monòcits i limfòcits que migren sota l'endoteli. Aquestes cèl·lules són estirades per glicoproteïnes adhesives expressades en la superfície de l'endoteli com a resultat de la lesió produïda per LDL oxidades i altres estímuls no coneguts, incloent-hi agents infecciosos. Molècules reguladores del creixement i quimiotàctiques lliurades per les cèl·lules endotelials faciliten el seu pas a través de l'endoteli fins a la capa inferior al múscul llis. Aquí els monòcits es transformen en macròfags i les cèl·lules T són activades. Els macròfags i cèl·lules T alliberen citocines i factors de creixement (IL-1, TNF α , Interferon, IL-2) i factors estimuladors de colònies que estimulen l'endoteli i alliberen factors addicionals com Factors de Creixement Derivats de les Plaquetes. El resultat és la proliferació del múscul llis i la formació de placa fibrosa. Aquest és el procés d'una inflamació crònica i és vist en avançades lesions ateromatoses en humans i en animals d'experimentació. ⁽⁴⁴⁾

2.2.3.2. FORMACIÓ DE LA PLACA D'ATEROMA

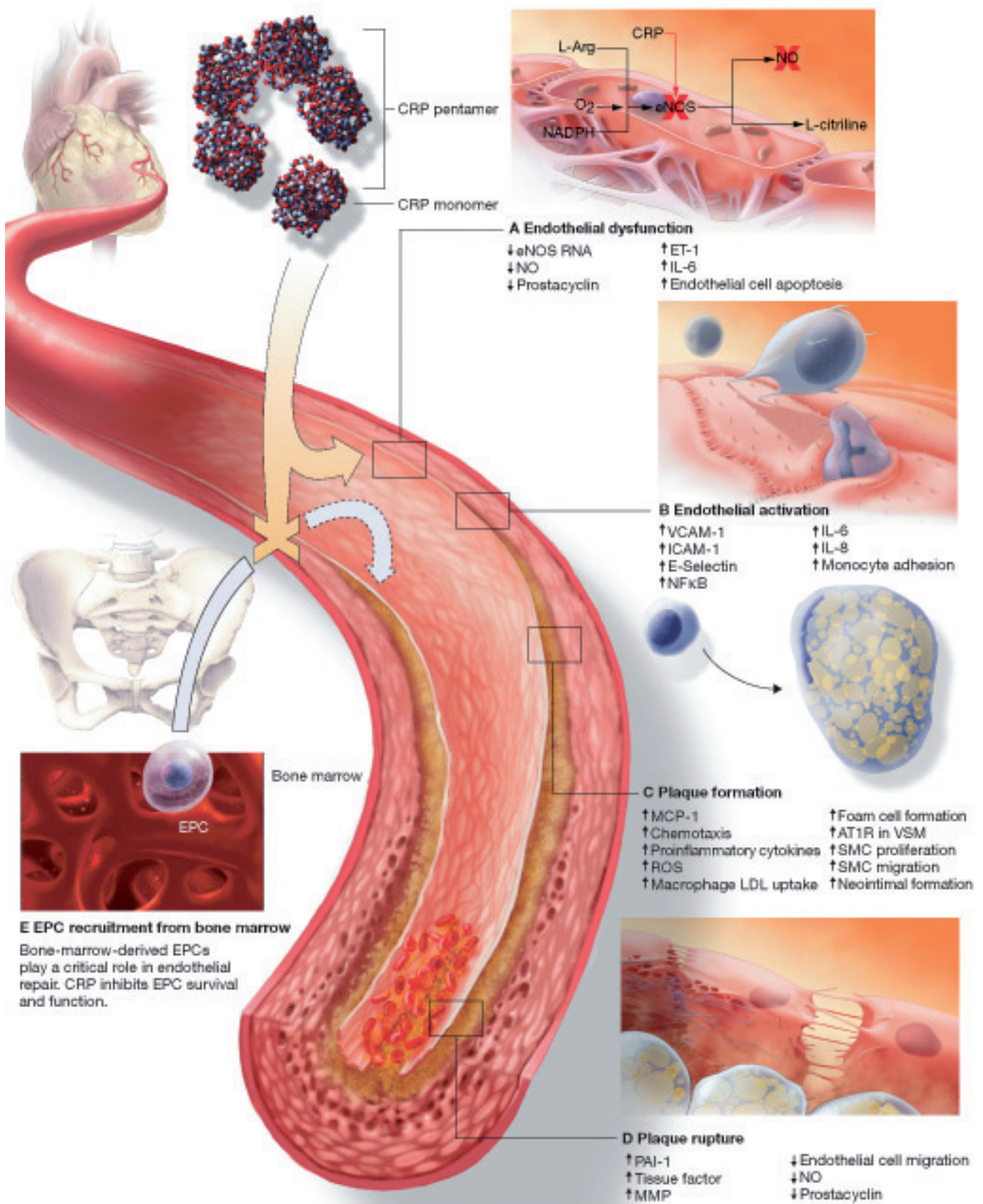
La formació de la placa d'ateroma comença amb l'activació de les cèl·lules endotelials, incloent-hi la sobreexpressió de les proteïnes d'adhesió dels leucòcits. El punt de sortida de la resposta inflamatoria endotelial és l'agressió per lipoproteïnes oxidades, hipertensió, diabetis mellitus i l'obesitat. La expressió de molècules d'adhesió com la VCAM-1, potencia el reclutament de cèl·lules de la sang inflamatòries.

Els monòcits units a VCAM-1 es troben en ateromes naixents; en models d'experimentació l'expressió de la proteïna VCAM-1 ha estat vista abans que l'adherència dels leucòcits a la paret arterial.

La proteïna de quimiotaxi de monòcits MCP-1 promou la migració dels leucòcits a l'íntima. A l'íntima, els factors estimuladors de colònies de macròfags promouen la diferenciació de monòcits a macròfags. Els macròfags expressen receptors *scavengers* que agafen les lipoproteïnes modificades i es transformen en cèl·lules escumoses.

Aquests fagòcits carregats de lípids excreten un gran nombre de mediadors que amplifiquen la inflamació i, en les parets dels vasos poden contribuir a l'acumulació addicional de leucòcits, proliferació de cèl·lules del múscul llis i remodelació de la matriu extracel·lular. Per les metaloproteases de la matriu, es pot degradar el col·lagen que tapa la placa fibrosa i fer-la més fràgil; els macròfags poden contribuir a la ruptura, i a la formació de trombe que pot precipitar accidents coronaris aguts.

De manera simultània, la resposta inflamatòria inhibeix producció de col·lagen i estimula la producció de macròfags, la producció de factors procoagulants que contribueixen a afavorir el trombe. Per tant la inflamació juga un paper central en l'inici i la progressió de l'arterioesclerosi tant com en les complicacions trombòtiques de la malaltia. ^(44, 45) (Figura 11).



(A) Endothelial dysfunction. **(B)** Endothelial cell activation. **(C)** Plaque formation. **(D)** Plaque rupture. **(E)** Inhibition of EPC survival and function. AT1R, angiotensin type I receptor; CRP, C-reactive protein; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; EPC, endothelial progenitor cells; ET-1, endothelin-1; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; IL-6, interleukin 6; IL-8, interleukin 8; MCP, monocyte chemotactic protein-1; MMP, matrix metalloproteinase; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NFκB, nuclear factor κB; NO, nitric oxide; PAI-1, plasminogen activator inhibitor type I; ROS, reactive oxygen species; SMC, smooth-muscle cells; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; VSM, vascular smooth muscle.

Figura 11. Funcions de la PCR en l'aterogènesi. Adaptat de *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. 2005; 2:29-36. www.nature.com/ncpcardio/journal.

2.3. MÈTODES PER A LA DETERMINACIÓ DE PCR. APLICACIONS EN MEDICINA PREVENTIVA

2.3.1. PCR D'ALTA SENSIBILITAT

Al llarg dels últims 30 anys la determinació en plasma de la PCR ha estat utilitzada en la clínica per detectar, preveure i monitorar l'evolució de processos infecciosos, inflamatoris i necròtics i conèixer l'eficàcia del tractament i el curs de la malaltia. En una infecció per fongs o virus els valors de PCR s'incrementen entre 10 i 50 mg/L. En una inflamació activa i infeccions bacterianes es troben concentracions entre 50 i 100 mg/L. En infeccions greus o en pacients postraumàtics els valors superen els 200 mg/L. ⁽¹⁸⁾

Fins fa pocs anys els mètodes analítics automatitzats per quantificar la PCR tenien un límit de sensibilitat i de concentració entre 3 i 5 mg/L. Els valors basals de la població de referència s'havien d'informar com de < 5 mg/L donada la sensibilitat de la tècnica, per altra part adequada per a l'aplicació pràctica de la prova.

No cal dir que el reconeixement, durant l'última dècada, del component inflamatori de l'aterogènesi porta a fer ús dels marcadors d'inflamació com a indicadors d'aquest procés o com a predictors de complicacions ateroscleròtiques. Estudis recents han demostrat que increments en la concentració de PCR dins de l'interval de referència eren associats amb futurs episodis coronaris en població considerada sana ⁽⁴⁶⁻⁵¹⁾. Per altra part, les tècniques de PCR utilitzades en episodis clínics d'inflamacions greus no tenien prou sensibilitat per a ser utilitzades des d'aquest punt de vista. Calia doncs quantificar els valors de PCR dins dels valors de referència de la població sana per anar a buscar un marcador de la inflamació implicada en l'arteriosclerosi ⁽¹⁸⁾. La primera metodologia emprada va ser l'ELISA. Tot seguit, els sistemes analítics automatitzats d'activitat assistencial van incorporar mètodes d'immunonefelometria i turbidimetria que proporcionaven prou sensibilitat i precisió a baixes concentracions. ^(52,53,54)

Es van comparar diverses metodologies i, tot i que el límit de detecció era diferents segons reactius comercials, es podien quantificar valors de PCR a partir de 0.4 mg/L. Els nous reactius analítics que incorporaven determinació de PCR molt més sensible es van anomenar PCR ultrasensible o PCR d'alta sensibilitat (PCRas). ⁽⁵²⁾

Les diferents metodologies han de ser lineals entre 0.4 i 10 mg/L, i per valorar el risc els resultats cal que s'interpretin en quartils o quintils. ⁽⁵⁵⁾

La quantificació de PCRas en estudis epidemiològics prospectius va permetre establir punts de tall que definien el risc en població sana d'homes i dones: la població de l'últim quartil dels valors de la PCR té de 2 a 4 vegades més possibilitats d'infart de miocardi, isquèmia cardíaca, malaltia arterial perifèrica o mort súbita, que en els que estaven al primer quartil. ⁽¹⁸⁾

2.3.2. PCR I FACTORS DE RISC DE LA MALALTIA CARDIOVASCULAR

La cardiopatia isquèmica

És un concepte introduït com a denominació alternativa a malaltia coronària ateroscleròtica. Implica un dèficit de flux coronari en relació amb les necessitats metabòliques del miocardi. La isquèmia s'ha d'entendre com un desequilibri entre l'oferta i la demanda d'oxigen.

Les característiques fisiopatològiques de la paret vascular permeten que una lesió coronària obstructiva del 80% d'una artèria coronària principal permeti mantenir un flux suficient per tal de no produir isquèmia. Ara bé, en

aquestes condicions, el desequilibri es pot posar de manifest per una demanda d'oxigen per esforç i que no pot ser satisfeta. Quan l'obstrucció d'una artèria coronària proximal és superior al 80%, aleshores es produeix isquèmia en repòs. L'efecte de la isquèmia es produeix sobre l'òrgan diana, el múscul cardíac, produint primer lesió i necrosi, i finalment clínica: dolor i angina com a manifestacions visibles d'un gran iceberg.

Les tres manifestacions clíniques de la isquèmia coronària són: l'angina de pit, l'infart de miocardi i la mort súbita.

Hi ha tres tipus d'angina :

L'angina d'esforç estable és un increment de la demanda amb la presència de placa fibrosa concèntrica.

L'angina vasoespàstica és la conseqüència d'un espasme d'una artèria sana o amb una placa d'ateroma.

L'angina inestable, habitualment en repòs, es deu a una reducció súbita del flux per una placa d'ateroma trencada o trombes de plaquetes i pot durar minuts. És la forma menys maligna de la síndrome coronària aguda (SCA). Si és persistent augmenta la necrosi i pot portar a l'infart agut de miocardi.

La mort súbita és deguda a una trombosi en l'artèria coronària o èmbols de plaquetes. ⁽⁴⁴⁾

La inflamació és la clau del mecanisme patogenètic en l'aterosclerosi. Des del punt de vista patològic, tots els diferents passos com són la iniciació, creixement i complicacions de la placa ateroscleròtica poden ser considerats com una resposta inflamatòria a una agressió. Són ben coneguts els més importants factors d'agressió que promouen l'aterogènesi (els anomenem factors de risc): el tabac, la hipertensió, les lipoproteïnes de baixa densitat i la hiperglicèmia. En els últims cinc anys i amb l'interès de poder aplicar mesures preventives en pacients d'alt risc, s'han estudiat a fons les aportacions dels marcadors inflamatoris com a potencials "predictors " per valorar la prevalença o incidència de la malaltia cardiovascular. ⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾

Aquests estudis han inclòs tant factors de risc proinflamatoris (LDL oxidades) com citocines proinflamatòries (IL1, TNF), molècules d'adhesió (selectines, molècula d'adhesió intercel·lular-1), citocines amb efectes hepàtics com IL-6 o els productes resultants de l'estímul com PCR, proteïna amiloide sèrica i d'altres proteïnes de fase aguda. No cal oblidar l'increment de leucòcits com a mesura d'inflamació. Tampoc cal oblidar que la cascada del procés inflamatori pot tenir altres causes diferents a l'aterosclerosi de l'artèria coronària, com són l'aterosclerosi en altres artèries o inflamacions sistèmiques. ⁽⁶⁰⁾

No obstant això, aquests marcadors inflamatoris, potencials predictors de risc de malalties cardiovasculars, no són útils en la pràctica clínica si no compleixen les següents característiques:

- Possibilitat d'estandarditzar l'assaig i tenir una variabilitat mínima.
- Independència de factors de risc establerts.
- Associació amb situacions de risc valorades en estudis de població i assaigs clínics.
- Poder millorar la predicció obtinguda amb factors de risc convencionals.
- Generalitzar els resultats en diferents grups de població.
- Cost acceptable.
- Guardar una relació lineal amb la malaltia cardiovascular.

Alguns marcadors d'inflamació compleixen aquests reptes. Ara bé, dins dels marcadors ens hem de fer aquestes preguntes, per altra part no sempre fàcils de respondre.

- És un marcador de risc o és un factor de risc ?
- En quin punt de la malaltia cardiovascular ha de ser considerat: aguda, crònica coronària, cerebral?
- Pot diferenciar un punt més incipient de la malaltia cardiovascular d'un estat avançat?
- El coneixement dels valors del marcador indiquen eficàcia de la teràpia?
- És efectiu l'increment de costos? Redueix altres despeses?
- Hi ha viabilitat tècnica, estabilitat de la mostra, prou precisió? (Taula 2) ⁽⁶⁰⁾

MARCADOR	ESTABILITAT	DISPONIBILITAT	ESTANDARDS	
			OMS	PRECISIÓ tècnica CV
Molècules d'adhesió Solubles: (E-selectina, P-selectina, IAM-1, VCAM-1)	Inestable	Limitada	No	<15%
Citocines: (IL-1 β , IL-6, 8, 10 TNF- α)	Inestable	Limitada	Si	<15%
Reactants de fase aguda: Fibrinogen	Inestable	Molts	Si	<8%
PAS A	Estable	Pocs	Si	<10%
PCR as	Estable	Molts	Si	<9%
Recòmpte de leucòcits	Estable	Molts	Si	<3%

Taula 2. Marcadors inflamatoris per a potencial ús clínic. ⁽⁶⁰⁾ Adaptat de *Markers of inflammation and cardiovascular disease. Circulation. Thomas A. Pearson, George A. Mensah, R. Wayne Alexander, Jeffrey L. Anderson and al.*

Un considerable nombre d'estudis han examinat l'associació malaltia cardiovascular – inflamació. Les comparacions dels diferents marcadors afavoreixen l'ús en la clínica de la PCRas. La determinació ha estat recomanada i seguida per Centres de Control i Prevenció de Malalties dels EUA. ⁽⁶⁰⁾

Concentracions bassals d'altres marcadors inflamatoris com la proteïna amiloide sèrica ⁽⁴⁷⁾, la IL-6 ⁽⁵¹⁾, la molècula d'adhesió intercel·lular soluble ⁽⁶¹⁾ i la P-selectina ⁽⁶²⁾, van mostrar la mateixa associació amb successos coronaris futurs. Es confirmava també així el coneixement que actualment es té de la biologia vascular de l'aterogènesi. ⁽⁶⁰⁾

Prevenió primària: en els últims cinc anys diferents societats clíniques han posat la seva atenció en l'estandardització dels marcadors inflamatoris, com PCR, tot buscant d'identificar pacients amb risc elevat de patir malalties cardiovasculars i que això permetés aplicar als citats pacients una prevenció primària ⁽⁶⁰⁾. Un metaanàlisi d'estudis basats en la població va comparar persones amb resultats de PCR as del primer tercil amb les del tercer tercil ^(63,64). Va haver-hi una gran unanimitat en trobar una relació entre la major possibilitat de patir episodis coronaris els individus que estaven al tercer respecte els del primer tercil. Aquests estudis inclouen els dos sexes i en general es tracta de persones d'edat avançada. ⁽⁶⁵⁻⁷¹⁾

Entre els estudis implicats en l'elaboració dels resultats hi havia l'estudi MONICA ⁽⁴⁸⁾, l'estudi en Women's Health ⁽⁷²⁾ l'Atherosclerosis Risk in Communities Study ⁽⁷³⁾ i els estudis NHANES (National Health And Nutrition Examination Survey) ^(74,75). En general tots coincidien en l'associació de concentració de PCR i incidència de malaltia coronària. Recents aportacions suggereixen associació amb incidència de mort ^(76,77) i malalties arterials perifèriques. ⁽⁷⁸⁾ Cal dir que alguns estudis han manifestat resultats més modestos i d'altres han exposat la limitació de les conclusions per raó de no estar prou representades les diferents ètnies, tret de població blanca americana o europea.

Per tal de poder identificar millor la població d'alt risc s'ha analitzat també el valor afegit de la PCR sobre els factors de risc ben establerts. Després de l'anàlisi estadística i d'ajustar totes les variables: edat, colesterol total, colesterol HDL, tabac, índex de massa corporal, diabetis, hipertensió, grau d'exercici i història familiar de malaltia coronària, la PCR continuava com una variable independent ^(72, 79 - 82). Cal dir que, en alguns estudis, era atenuada la significació dels valors de la PCR del tertíl superior després de l'ajustament. La població més beneficiada és la femenina després d'ajustar els valors de PCR amb altres factors de risc ⁽⁷²⁾, i també la gent gran a l'analitzar patologies ateroscleròtiques subclíniques ⁽⁶⁹⁾. Això permet que ambdues poblacions puguin estar millor identificades per entrar en un programa de prevenció primària.

Actualment va creant més interès l'estudi de patologia de la síndrome metabòlica (SM), la seva associació amb una resposta inflamatòria sistèmica i amb un increment del risc de malaltia cardiovascular ^(83,84). Tot i que el factor hereditari i factors ambientals contribueixen a l'aparició de la SM, encara és poc conegut el mecanisme patogenètic. De totes maneres els ha estat reconegut un paper important a les citocines proinflamatòries TNF ⁽⁸⁵⁾ i la IL-6 ⁽⁸⁶⁾: les dues estan produïdes en quantitats prou importants per les cèl·lules del teixit adipós humà. El TNF perjudica l'entrada de glucosa a una gran quantitat de cèl·lules i disminueix l'activitat de la lipoproteïna lipasa. Les dues citocines incrementen la lipogènesi hepàtica i a més a més provoquen resposta de fase aguda.

En un estudi basat en la població alemanya (Universitat d'Ulm) s'ha considerat l'associació dels factors integrants de la SM i la PCR. Es va observar que hi havia una correlació fortament positiva (amb $P < 0.0001$) entre la PCR i l'edat, índex de massa corporal (body mass index, BMI), colesterol, glucèmia en dejú, triglicèrids i àcid úric, i una correlació fortament negativa amb colesterol HDL. La relació més forta era observada entre la PCR i BMI ^(87,88).

La majoria d'individus de la població tenia al menys 1 dels factors de la SM. Es van classificar els individus en 3 categories segons el nombre de factors o variables de la SM que reunissin: categoria I, sense SM (0-1 factors), categoria II, SM moderada (2-3 factors) i categoria III, SM greu (4-7 factors). La majoria dels individus eren de la II, cosa que indica que la SM moderada és freqüent en la població. Un 1.1% tenia més de 5 factors. Els resultats mostraven una relació positiva i estadísticament significativa entre la PCR i el nombre de factors de la SM. ⁽⁸⁹⁾

Cal conèixer la PCR com a paràmetre que pot ajudar a valorar pacients amb alt risc, però cal també afegir que no hi ha correlació entre els valors de PCR i l'extensió o massa de l'aterosclerosi. El concepte de massa d'aterosclerosi s'ha pogut valorar amb la prova d'ultrasons Doppler o tomografia. ⁽⁹⁰⁻⁹²⁾ L'interès del valor de la PCR seria mesurar l'activitat dels macròfags i limfòcits, o sigui, mesurar la desestabilització. ⁽⁹³⁻⁹⁶⁾ Amb tot continua essent objecte de recerca.

Prevenció secundària. Un gran nombre d'estudis han examinat la PCR i marcadors inflamatoris com a predictors de malalties cardiovasculars recurrents, fins i tot mort, en diferents aspectes: risc a curt termini, llarg termini, risc després de revascularització.

Quan el pacient presenta la SCA, cal utilitzar punts de tall diferents d'aquells per predicció en pacients asimptomàtics. S'han proposat valors > 10 mg/L en la SCA i valors > 3.0 mg/L en pacients amb malaltia coronària estable. ⁽⁶⁰⁾

En SCA, la PCR prediu infarts de miocardi recurrents independentment de la troponina. ⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾

Per estudis realitzats en pacients amb infart i malalties arterials perifèriques els valors de PCR semblen prou importants per ser factor pronòstic i poder estratificar el risc de pacients amb malaltia cardiovascular instaurada. ⁽¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾

Tot i que la sensibilitat i precisió és prou elevada en les metodologies de les quals disposen els laboratoris clínics, diferents grups de treball han valorat amb molta cura les situacions que poden influir en els resultats de la PCR. Es descriuen en la *Taula 3*. ⁽⁶⁰⁾

Diferents estudis en població han apostat per estudiar com aquests aspectes de l'anomenat estil de vida incrementen valors de la PCR. (103-105)

En la taula es fa esment de la població amb tractament hipolipemiant (106-107) Com queda la informació de la PCR? Pot implicar millora i disminució de risc el fet de disminuir els nivells de PCR? (41) Aquest tema continua essent objecte d'estudi. No presenta canvis "circadians" però en cap moment es pot oblidar la variabilitat individual atès que és una proteïna de fase aguda.

INCREMENT DE NIVELLS	DESCENS DE NIVELLS
Pressió elevada	Consum moderat d'alcohol
Índex de massa corporal elevat	Exercici / increment d'activitat
Tabac	Baix pes
Síndrome metabòlic / diabetis mellitus	Medicació : estatines, fibrats, niacina
Low HDL / triglicèrids elevats	
Ús de teràpia amb estrògens / progesterona	
Infeccions cròniques(gingivitis bronquitis)	
Inflamacions cròniques (artritis reumatoide)	

*Taula 3. Característiques de pacients i condicions associades amb increments o descens de nivells de PCR. (60)
Adaptat de Markers of inflammation and cardiovascular disease. Circulation. Thomas A. Pearson, George A. Mensah,
R. Wayne Alexander, Jeffrey L. Anderson and al.*

2.3.3. PCR I PROTOCOLS ACTUALS EN MEDICINA CARDIOVASCULAR

El desembre del 2002, l'American Heart Association (AHA) en coordinació amb grups d'estudi de recerca clínica, bioquímica i epidemiològica va emetre unes recomanacions sobre l'ús de marcadors inflamatoris i malaltia cardiovascular en clínica i en la pràctica de la Sanitat Pública. Aquestes recomanacions estaven basades en l'evidència, segons el sistema de l'American College of Cardiology/AHA. (60)

En base a aquesta línia de qualitat i considerant les qüestions plantejades pel que fa a la PCR as, es feien les següents guies i/o protocols.

- a) La PCRas és el marcador inflamatori aconsellat. Cal mesurar-la dues vegades (en dejú o no) en pacients amb estabilitat metabòlica. Es fixen les unitats, sempre en mg/L.
- b) S'estableixen 3 tipus de risc: baix, mitjà i elevat corresponent als tertils de valors (< 1.0 ; 1.0 – 3.0; i > 3.0 mg/L).
- c) La determinació de PCRas, en població sana, sense malaltia cardiovascular ha de motivar millorar l'estil de vida de les persones.

- d)** En tot aquell pacient que presenta 2 cops valors > 10 mg/L cal buscar altres causes d'inflamació o infecció.
- e)** És recomanable determinar la PCRas, juntament amb altres factors de risc i establir risc absolut en prevenció primària.
- f)** En pacients amb malaltia coronària estable i en pacients amb la SCA, pot ser útil com a marcador independent per valorar probabilitat d'episodis recorrents incloent-hi l'infart o la mort.
- g)** Un nou valor potencial en estudi és la disminució de PCR observada quan hi ha tractament amb HMG – CoA ⁽¹⁰⁸⁾. No està clar si la reducció de PCR, demostrada amb pacients amb tractament, vol dir disminució de risc. Hi ha molt per saber encara sobre els valors circulants de PCR. ^(41,60)
- h)** Juntament amb aquestes directrius o guies, es recorda les variables conegudes preanalítiques considerades en la Taula 3 i les variables analítiques que han de ser sempre considerades per aplicar correctament els resultats de la determinació de PCRas. ^(60,109,110)

3. HIPÒTESI I OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

La hipòtesi plantejada en aquesta Tesi Doctoral és que de l'obtenció de dades de concentració de PCR en grups de població de l'àrea mediterrània podem extreure criteris com tenir valors de referència, estudiar la influència de factors nutricionals, hàbits de vida, efecte d'algunes patologies i conèixer les possibilitats per incloure la quantificació d'aquest paràmetre dins de protocols de sanitat pública i/o assistència primària.

Els objectius han estat els següents:

1r Estudi

- Avaluar un immunoassaig turbidimètric unit a partícules (PETIA), d'alta sensibilitat, per a la mesura de les concentracions de PCR .
- Investigar canvis cronològics en la concentració de PCR en dones fèrtils de la nostra població, des de la pre-concepció i durant el procés normal de la gestació.
- Estudiar la relació dels valors de la PCR al llarg de gestació, amb l'índex de massa corporal previ a l'embaràs i en el part, també la relació amb l'edat i l'associació d'aquesta mateixa amb l'augment de pes durant l'embaràs i el pes del fetus i placenta en el moment del part.

2n Estudi

- Valorar els nivells de PCR en una població sana, adulta, representativa de la població de l'àrea mediterrània i tenir-ne un valors de referència.
- Estudiar els efectes de nutrients de la dieta i de factors involucrats en l'estil de vida en la concentració de PCR en aquesta població.

3r Estudi

- Valorar els canvis en la concentració en plasma la PCR i MCP-1 en pacients amb malaltia hepàtica crònica i investigar la relació dels dos paràmetres amb els diferents estadis inflamatoris segons la histologia hepàtica.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

4. PARTICIPANTS I MÈTODES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

4.1. PARTICIPANTS

1r Estudi

Les participants són dones en edats de gestació (de 18 a 35 anys) amb voluntat de quedar embarassades i que estaven disposades a ser sotmeses a un seguiment de la seva gestació pel que fa a obtenir mostres en els períodes previstos fins al naixement i també respondre als formularis que permetien tenir les dades per poder completar els estudis implicats. Eren dones voluntàries, sanes, de l'àrea de Reus (ciutat costanera de Catalunya amb 100.000 habitants en el moment de l'estudi) i pobles propers. La captació de dones voluntàries es va fer utilitzant els mitjans de comunicació locals i els serveis ciutadans de l'Ajuntament de la ciutat. Les participants formen part d'un estudi longitudinal realitzat per la Unitat de Medicina Preventiva de la Facultat de Medicina Rovira i Virgili amb la col·laboració del Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital Universitari de Sant Joan, amb l'aprovació del comitè ètic de l'Hospital i amb el consentiment informat de les participants, d'acord amb la declaració d'Hèlsinki. Els criteris d'exclusió van ser tenir una malaltia crònica que obligués a una atenció personalitzada o tractament o bé la no-concepció després de 18 cicles menstruals. En el moment de fer els estudis que constitueixen aquesta Tesi Doctoral es va poder acudir a les mostres de sèrum de 39 participants de les quals es disposava d'alíquotes de tots i cada un dels períodes d'estudi.

Les mostres van ser obtingudes al matí, en dejú. S'obtenia mostra cada 3 períodes menstruals. Les mostres d'abans de la concepció oscil·laven entre les 2 i 10 setmanes. L'embaràs va ser confirmat per ultrasons. Durant el primer trimestre l'extracció es va fer entre els 53 i 59 dies d'embaràs. Al 2n trimestre la mostra va ser obtinguda a les 20 setmanes de gestació i al 3r trimestre va ser obtinguda a les 32 setmanes. En ingressar a l'hospital pel part es va fer l'última extracció. Totes les participants van completar les dades següents: pes, l'índex de massa corporal (body mass index BMI) i quantitat de greix dins d'una setmana de l'extracció de mostra i en el part. Pel que fa al BMI s'obté de la relació: pes/alçada amb una sensibilitat de 0.1 Kg; el paràmetre massa - greix a partir del plegament cutani del bíceps, tríceps i regions suprailíaca i subescapular.

2n Estudi

Els participants eren 784 subjectes de la mateixa àrea geogràfica anomenada anteriorment. Van ser seleccionats de forma aleatòria dels registres de dos ajuntaments (febrer 1999-juny 2000). Van ser eliminats el 22.1% per no ser localitzats (15.8 %) o bé per estar en medicació que pogues interferir amb el motiu de l'estudi (6.3%). Dels 77.9% invitats a participar, el 34.5 va refusar i solament van quedar de la mostra possible 65,9%. Els participants acceptaven una revisió mèdica, una extracció de sang i registrar els aliments de la dieta de 3 dies. Després de l'examen mèdic i anàlisi de sang, van quedar fora 50 participants per sospita de malaltia renal, hepàtica o neoplàsia. L'ús de medicació solament era motiu d'exclusió si hi havia interferència amb els nutrients considerats d'interès (vitamines, metabolisme homocisteïna). Finalment l'estudi es va dur a terme amb 359 participants (172 homes i 187 dones d'edats entre 18 i 75 anys i mitjana de 42 anys). L'estudi va ser aprovat pel comitè ètic de l'Hospital Sant Joan de Reus i d'acord amb la Declaració d'Hèlsinki. De cada individu s'obtenia un historial mèdic i un qüestionari detallat dels seus hàbits i estil de vida.

La seva dieta i salut mental eren també analitzades així com els hàbits de la ingesta d'alcohol i de tabac. La mostra de cada subjecte es va obtenir en dejú (8-9 hores del matí). Es van suprimir els dies des de final de desembre fins al final de gener per tal de no incloure dietes poc representatives.

3r Estudi

Els participants de l'estudi van ser 110 individus diagnosticats de malaltia hepàtica amb diferents graus d'inflamació. Els participants van ser pacients visitats al Servei de Medicina Interna del nostre Hospital, als quals el clínic havia sol·licitat una biòpsia hepàtica. Els pacients van ser diagnosticats de malaltia hepàtica de diferents graus de gravetat o inflamació mitjançant l'índex d'activitat de Knodell.

4.2. MATERIALS I MÈTODES ANALÍTICS

Per a la valoració de l'immunoassaig turbidimètic de la PCRas, es va utilitzar l'analitzador de química clínica automàtic 1800 ILAB, d'accés aleatori. El reactiu va ser de BIODATA (Quantex hs-CRP kit, Biokit, S.A. Barcelona Spain). El mètode de referència va ser la immunonefelometria de Dade Behring amb una linealitat entre 0.17-210 mg/L. Per a l'avaluació del mètode turbidimètic i per a la comparació de mètodes es van utilitzar mostres de pacients de rutina. L'ús d'aquest material per avaluar està d'acord amb els criteris de la European Law for Medical and Diagnostic Products.

En els 3 estudis, la PCR es va determinar en mostra de sèrum, que es va mantenir a -80° .

Per a la determinació d'homocisteïna es va utilitzar plasma obtingut amb anticoagulant EDTA. L'homocisteïna plasmàtica es va mesurar amb un immunoassaig de fluorescència polaritzada (FPIA) del sistema analític Abbot Diagnostics. Les determinacions de colesterol total, triglicèrids i colesterol HDL van ser realitzades en sèrum, utilitzant tècniques estàndard (reactius ITC Diagnostics) i el sistema analític 1800ILAB. El colesterol LDL es va estimar amb l'equació de Friedewald.

Els marcadors hepàtics: albúmina, bilirubina, alanina aminotransferasa (ALT), gamma-glutamil transferasa (GGT) i fosfatasa alcalina (ALP) van ser mesurats en sèrum i amb reactius i sistema analític de Beckman Coulter. L'espècimen per a la valoració de MCP-1, 3r estudi, va ser plasma -EDTA. La mostra va ser centrifugada i congelada dins de les 4hores posteriors a l'extracció. La valoració de MCP-1 es va realitzar amb mètode manual ELISA (Prepotech London, UK).

4.3. MÈTODES ESTADÍSTICS

S'han utilitzat els mètodes estàndard (Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilks) per observar si hi havia una distribució normal de dades si fos necessari per a l'aplicació d'un test estadístic.

Al primer estudi, els valors de PCR mesurats per PETIA i per nefelometria es van comparar amb l'anàlisi de regressió de Deming i amb gràfiques de Bland-Altman.

L'anàlisi de varianza (ANOVA) per a mesures repetides va ser utilitzat per explorar canvis en les concentracions de PCR en un mateixa dona embarassada des de la preconcepció fins al moment del part. També es van comparar les mitjanes de cada punt amb la resta de punts.

Un model de regressió lineal múltiple va ser utilitzat per valorar com afectaven totes les variables: edat, nombre de parts, BMI preconcepció, setmanes de gestació, pes i increment de greix durant l'embaràs, sexe del nadó i pes del nounat i placenta en els valors de la PCR.

Al segon estudi, per analitzar les diferències entre els quartils de PCR amb les variables estudiades, es va utilitzar l'ANOVA o el mètode de Kruskal - Wallis seguit pel test de la U de Mann Whitney.

Per associar la PCR amb les diferents variables es va utilitzar el model de regressió lineal múltiple. L'anàlisi es va realitzar en dues fases. A la primera fase s'hi inclouen aquells factors ja descrits com a associats a la PCR com tabac, edat, BMI, concentracions de triglicèrids i piridoxina. En una segona fase es va introduir el sexe i tots els nutrients i es van eliminar els que no tenien una relació independent.

Al tercer estudi, les diferències entre tots els grups de població, classificats per índex de Knodell, es van analitzar

per ANOVA. La ρ d'Spearman va ser utilitzada per avaluar el grau d'associació entre PCR i MCP-1. Un model de regressió múltiple va ser emprat per verificar l'associació entre índex de Knodell total i les variables bioquímiques mesurades. Es va valorar l'exactitud diagnòstica de cada test amb l'aplicació de les corbes ROC, mesurant l'àrea sota la corba. Es van utilitzar intervals de confiança atès que les variables no tenien una distribució normal.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

Article 1

Evaluation of a high-sensitivity turbidimetric immunoassay for serum C-reactive protein: application to the study of longitudinal changes throughout normal pregnancy. Clin Chem Lab Med. 2005;43:308-313

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

Evaluation of a high-sensitivity turbidimetric immunoassay for serum C-reactive protein: application to the study of longitudinal changes throughout normal pregnancy

Núria Bertran¹, Jordi Camps^{1,*}, Joan Fernández-Ballart², Michelle M. Murphy², Victoria Arijaz², Natàlia Ferré¹, Mònica Tous¹ and Jorge Joven¹

¹ Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan,

² Unitat de Medicina Preventiva i Salut Pública, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Institut de Recerca en Ciències de la Salut, Reus, Catalunya, Spain

Abstract

C-Reactive protein has been associated with several complications of pregnancy. The aims of the present study were: (1) to evaluate a turbidimetric immunoassay for the measurement of C-reactive protein; and (2) to investigate the chronological changes of the levels of this protein from preconception throughout normal pregnancy and its relationship with variables associated with preconception and pregnancy outcome. Inter-assay imprecision was <5% for C-reactive protein >1 mg/L and 18% at a mean value of 0.33 mg/L. The limit of detection was 0.10 mg/L. The method was linear between 0.10 and 30 mg/L. There were no observed interferences from jaundice, hemolysis, lipemia or paraproteinemia at the levels studied. There was good agreement with the nephelometric method. A total of 39 women were studied at preconception, at 8, 20 and 32 weeks of pregnancy, and in labor. Preconception C-reactive protein concentration was 1.17 ± 0.18 mg/L and increased ($p < 0.001$) throughout pregnancy up to 5.69 ± 0.82 mg/L. Body mass index at preconception and weight gain during pregnancy were the main factors associated with this increase in C-reactive protein.

Keywords: C-reactive protein; inflammation; method evaluation; pregnancy.

Introduction

C-Reactive protein (CRP) has been associated with several diseases, involving endothelial dysfunction and systemic inflammation, such as type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome, and cardiovascular dis-

ease (1–10). Endothelial dysfunction and inflammation are involved in the pathogenesis of preeclampsia and other important complications of pregnancy, including gestational diabetes and fetal overgrowth (11–13). Hence, its measurement has recently aroused considerable interest. Several studies have analyzed serum CRP concentrations at different stages of pregnancy in order to investigate its association with various pregnancy complications (12–16). However, appropriate interpretation of these studies should be based on knowledge of the temporal changes in serum CRP concentrations during normal pregnancy, which have not yet been reported.

The development of high-sensitivity CRP assays has played a pivotal role in the exploration of its involvement in endothelial dysfunction and subclinical inflammation (17). These methods allow the reliable measurement of low concentrations of serum CRP and are often easily automated, which permits the investigation of serum CRP in healthy populations.

The aim of this study was: 1) to evaluate a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) for the measurement of CRP concentrations; and 2) to investigate the chronological changes in the levels of this protein from preconception throughout normal pregnancy, and its relationship with pre-pregnancy and delivery maternal body mass index (BMI), age, parity, weight gain during pregnancy, and fetal and placental weight at birth.

Materials and methods

Assay method

The CRP PETIA was performed with an ILab 1800, an automated, random-access, discrete clinical chemistry analyzer (Instrumentation Laboratories, Milan, Italy). This instrument allows spectrophotometric and turbidimetric reactions to be carried out at 37°C, using one or two reagents, in bar-coded primary tubes. We used commercial reagents obtained from Biokit (Quantex hs-CRP kit, Biokit, S.A., Barcelona, Spain). The assay requires two reagents. In the first step, 6 μ L of serum was diluted with 130 μ L of 0.17 mol/L glycine buffer (pH 9.0) with sodium azide (0.8 g/L) and incubated for 192 s. In the second step, the diluted sample was mixed with a suspension of 130 μ L of uniformly sized polystyrene latex particles (approx. 180 nm in diameter) coated with anti-human CRP monoclonal antibody, and incubated for 324 s. The resulting agglutination was read at 570 nm. Both reagents are liquid, require no preparation before the analysis and are stable at 4°C for up to 1 year. The linearity claimed by the manufacturer ranged between 0.25 and 20 mg/L.

*Corresponding author: Dr. Jordi Camps, Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, C/. Sant Joan s/n, 43201-Reus, Catalunya, Spain
Phone: +34-977-310300, Fax: +34-977-312569,
E-mail: jcamp@grupsgassa.com

Values higher than 20 mg/L were automatically diluted one-third and re-run, so linearity could be expanded to 60 mg/L.

Calibrators and controls

The PETIA assay calibrators were supplied by Biotek (Quantex ultrasensitive CRP standard multipoint) and consisted of five vials of liquid standards from human sources ranging from 0.50 to 20.00 mg/L. These calibrators have been standardized according to Certified Reference Material 470 from the European Community Bureau of Reference (Institute for Reference Materials and Methods, Geel, Belgium). The analyzer automatically performs calculation of results by point-to-point interpolation. The control (CRP range 1.24–1.87 mg/L) was also from Biotek. Four pools of sera designated A–D and with increasing CRP concentrations were used for performance studies. The sera were obtained from routine clinical samples, mixed and then frozen. When necessary, the samples were thawed and mixed gently for 20 min on a rotating mixer.

Imprecision study

Intra-assay imprecision was determined with 20 replicate analyses of the control and the four pools. To assess inter-assay imprecision, aliquots of these controls stored at -20°C were analyzed over 20 consecutive days.

Recovery

We added 20 μL of three different calibrators (20.00, 10.00 and 5.00 mg/L) to 180 μL of a sample containing undetectable levels of CRP.

Linearity and detection limit

Linearity was assessed by measuring serial dilutions of three high samples (valued at 22.3, 24.8, and 31.5 mg/L) in physiological saline solution, from undiluted up to a dilution of 1/128. The assessment of linearity assumed that the analyzer automatically diluted one-third of the high samples. The detection limit was determined by measuring the absorbance of the reagent blank 20 times. The mean and SD were calculated and the detection limit was defined as the CRP concentration for an absorbance equal to the mean of the reagent blank value $+2$ SD.

Interference

Interference from triglycerides, hemoglobin, and bilirubin was assessed as previously described (18). Pools B, C and D were supplemented with chylomicrons, hemoglobin, or bilirubin at various concentrations, and the percentage recovery was then calculated. Experiments were carried out in triplicate.

Effect of paraproteinemia and rheumatoid factor

The effect that non-specific aggregation and/or cross-reactivity from paraproteinemia or rheumatoid factor had on the CRP determination was assessed as described elsewhere (18). Serial dilutions (300 μL) in physiological saline of sera from patients with immunoglobulin (Ig)G, IgM, and IgA myeloma or rheumatoid arthritis were added to identical volumes of pool C, gently mixed on a Coulter mixer (Coulter Electronics Ltd, Hialeah, FL, USA) for 20 min and analyzed. The percentage recovery was then calculated. Assessments were carried out in triplicate.

Method comparison

The PETIA CRP method was compared with an immunonephelometric measurement on a Behring nephelometer II (Dade-Behring, Liederbach, Germany). The latter technique was taken as the reference method. The manufacturer's claimed analytical range for the Behring method was 0.17–210 mg/L. The limit of detection was 0.01 mg/L. Intra- and inter-assay CV were 4.1% and 7.5%, respectively. Method comparison was performed on 100 serum samples (55 men, 45 women, aged from 21 to 65 years) obtained from routine analysis requests, and covering a wide range of CRP concentrations. The use of leftover materials for evaluation of diagnostic methods is in agreement with the European Law for Medical and Diagnostic Products. These samples were analyzed double blind in parallel on both instruments.

Participants

A total of 39 healthy women aged between 18 and 35 years with the intention of immediately becoming pregnant participated in the study. They were a subgroup of a more extensive longitudinal study on the evolution of women's nutritional status before conception and throughout pregnancy, which was carried out in the Unit of Preventive Medicine and Public Health of our university. The design and background to this study have been explained in detail previously (19). The approval of the Ethics Committee of our hospital was obtained and all participants gave their signed informed consent in accordance with the declaration of Helsinki.

On the week of each blood sample collection, subjects were weighed (kg) using scales with an accuracy of 0.1 kg. At preconception their height (m) was also measured to an accuracy of 0.1 cm. Their BMI at preconception was then calculated as $\text{weight}/\text{height}^2$. Skinfold measurements at the triceps, biceps, suprailiac and subscapular regions were performed at preconception and the last pregnancy visit and used to calculate the percentage fat mass as previously described (20). Blood samples were drawn from the antecubital vein at preconception (2–10 weeks before conception), at 8, 20 and 32 weeks of pregnancy, and on admission to hospital with confirmed labor. All blood samples were fasting with the exception of those taken during labor. Serum for CRP measurement was stored at -80°C .

Statistical analysis

We used standard methods (Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilks) to check whether variables were normally distributed when required for the application of a statistical test. For method evaluation, values of CRP by the two assays were compared using the Wilcoxon rank-sum test. The association between variables was measured using Deming regression analysis (21). The degree of agreement between the turbidimetric and nephelometric methods was estimated using the Bland-Altman graphical procedure (22). A one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was used to explore the changes in CRP concentrations over pregnancy time (intra-subject factor). A repeated contrast (comparing the mean at each time point with the mean at the subsequent time point, maintaining the type I error at 5%) was used to test the significance of differences in CRP means, between the different time points of pregnancy, labor and preconception. A multiple linear regression model was fitted to test the effect of maternal age, parity, preconception BMI, gestation length, weight and fat mass gain during pregnancy, newborn sex, and birth and placenta weight on CRP. Diagnosis of residuals was used to test whether the

Table 1 Analytical imprecision of the CRP PETIA.

Control material	Mean CRP, mg/L	Intra-assay		Inter-assay	
		SD, mg/L	CV, %	SD, mg/L	CV, %
Commercial	1.40	0.04	2.86	0.06	4.29
Pool A	0.33	0.05	15.15	0.06	18.18
Pool B	2.18	0.05	2.29	0.10	4.58
Pool C	10.80	0.10	0.92	0.19	1.76
Pool D	17.34	0.13	0.75	0.26	1.50

Table 2 Effects of paraproteinemia and rheumatoid factor on the PETIA for CRP.

Constituent	Recovery, %			
	1:2 dilution	1:4 dilution	1:8 dilution	1:16 dilution
IgG (54 g/L)	101 (5)	100 (3)	100 (2)	99 (2)
IgA (40 g/L)	103 (3)	100 (2)	101 (6)	104 (2)
IgM (36 g/L)	100 (4)	101 (5)	103 (5)	107 (4)
RF (800 kIU/L)	100 (3)	99 (2)	98 (5)	100 (5)

Mean (SD) percentages of recovery (n=3) after addition of serial dilutions of sera from three patients with myeloma and one patient with rheumatoid arthritis to aliquots of pool C. RF, rheumatoid factor.

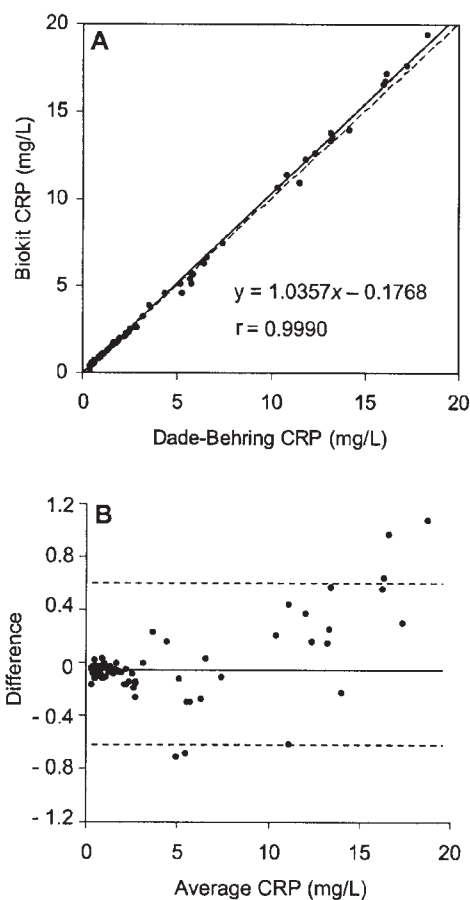


Figure 1 (A) Deming regression analysis and (B) Bland-Altman plots for CRP measurements by the Biokit and Dade-Behring methods. In (A) the dashed line represents the line of identity; in (B), the 95% limit of agreement.

assumptions for the regression model were fulfilled. We refused the null hypothesis when the p-value was equal to or lower than 0.05. Except when the contrary is indicated, results are expressed as means and SD. Version 11.0 of the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows was used for data analysis.

Results

Assay performance

Intra- and inter-assay coefficient of variation (CV) values are shown in Table 1. They were lower than 10%, except for pool A (CRP 0.33 mg/L), which had values of 15% and 18%, respectively. The percentage recovery from triplicate measurements was $99.0 \pm 7.0\%$. The assay was linear over the range studied. The regression line for observed vs. expected values was $y = (0.989 \pm 0.043)x - (0.06 \pm 0.23)$ ($r = 0.999 \pm 0.001$). The detection limit was 0.10 mg/L. There was no substantial interference from hemoglobin (≤ 5 g/L), jaundice (bilirubin ≤ 175 $\mu\text{mol/L}$), or hyperlipidemia (triglycerides ≤ 5.00 mmol/L). We did not observe any significant interference from paraprotein IgG up to 27 g/L, IgM up to 18 g/L, IgA up to 20 g/L, or rheumatoid factor up to 400 kIU/L (Table 2).

Method comparison

For 100 samples, the median value for CRP was 2.02 mg/L (interquartile range 0.85–5.74 mg/L) for the Biokit assay and 2.20 mg/L (interquartile range 0.90–6.05 mg/L) for the Dade-Behring assay. These differences were statistically significant ($p = 0.012$) and indicated a slight underestimation by the Biokit method. Figure 1A shows the results of Deming regression analysis. There was direct significant asso-

Table 3 Baseline and delivery characteristics of women (n=39) and their neonates.

	Mean (SD)	Frequency, %
Age, years	29.2 (2.7)	
Parity		
0		66
1		34
BMI (preconception)	23.3 (3.1)	
Gestational age, weeks	40.0 (0.93)	
Weight gain, kg	11.2 (3.1)	
Fat mass variation, kg	0.82 (2.13)	
Child sex		
Male		39
Female		61
Birth weight, g	3387.6 (505.9)	
Placenta weight, g	673.5 (140.9)	

ciation between both measurements ($r=0.999$; slope, 1.03 with SE 5.71×10^{-3} ; y-intercept, -0.17 with SE 3.89×10^{-2}). Figure 1B is a Bland-Altman plot showing the degree of agreement between both methods. The average difference was -0.02 mg/L (95% confidence interval -0.07 to 0.04 mg/L). Maximum absolute difference between methods was 1.2 mg/L at a mean CRP concentration of 18.83 mg/L.

Study in pregnant women

Baseline and delivery characteristics of all participants are presented in Table 3. Serum CRP concentration before conception was 1.17 ± 0.18 mg/L. This parameter significantly increased ($p < 0.001$) throughout pregnancy up to 5.69 ± 0.82 mg/L at labor (Figure 2). The combined effect of the variables studied on CRP at different periods was analyzed by multiple linear regression analysis and is shown in Table 4. There was a borderline relationship ($p=0.057$) between mean BMI and CRP during the preconception period. The relationship between preconception BMI and CRP during pregnancy was clearly significant ($p=0.001$) at 8 and 20 weeks, but disappeared by week 32 and during labor. Weight gain was significantly associated with serum CRP concentrations at week 8 ($p=0.037$)

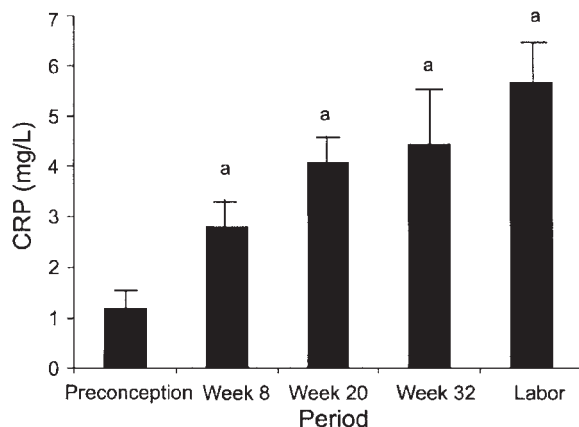


Figure 2 Serum CRP concentrations (mean and SD) in women at preconception and throughout pregnancy. ^a $p < 0.001$ with respect to preconception.

and total weight gain during pregnancy with CRP during labor ($p=0.046$). None of the other variables showed any significant relationship with serum CRP concentrations in any of the periods of investigation.

Discussion

The analytical performance of the PETIA evaluated in the present study shows that this method is comparable to most reported high-sensitivity CRP turbidimetric immunoassays (23–27). Imprecision was $< 5\%$ for all the control materials studied, except for pool A (CRP 0.33 mg/L), which was 18%. In this respect, our results differ from those previously published for this method (25) and indicate that sensitivity would need to be improved to accurately measure CRP concentrations in the lowest range. The detection limit was 0.1 mg/L. Functional sensitivity [CRP concentration corresponding to a 20% CV; defined in ref. (27)] was 0.30 mg/L. Recovery was close to 100% and linearity was excellent over the entire measurement range. Lipemia, jaundice and hemolysis appeared to have little influence on the assay. We did not observe any interference from rheumatoid factor nor from paraproteinemia, irrespective of whether the paraprotein was IgG, IgA or IgM. For agreement studies, we compared the results obtained with our PETIA with those obtained with a Behring II nephelometer. The latter method has been clinically validated (27). We observed good agreement between both methods, with differences between both methods not higher than 10%.

Using the PETIA we performed a prospective study to investigate the chronological changes in serum CRP concentration before and throughout normal pregnancy. The study of inflammatory markers in pregnancy has received considerable attention from researchers recently. Tjoa et al. (15) reported an association between high CRP concentrations during the first trimester and the subsequent development of preeclampsia or the delivery of a growth-restricted baby. Keski-Nisula et al. (28) reported that CRP concentrations were higher in parturient mothers who presented with cesarean section with membrane rupture than in those with intact membranes. Hvilsom et al. (29) observed that high CRP concentrations at the beginning of pregnancy were associated with a two-fold increased risk of preterm delivery. These results highlight the importance of appropriate understanding of the changes in serum CRP concentrations in normal pregnancy. Several investigations concluded that BMI is the main determinant of CRP in both lean and obese pregnant women (13, 14, 30). However, all of these were cross-sectional studies, which limits the applicability of their findings to different stages of pregnancy. Ours, on the other hand, had a prospective, longitudinal design including the preconception period, which allowed measurement of the increase in serum CRP throughout pregnancy and the investigation of factors that could influence it. We observed that maternal weight was the main deter-

Table 4 Association of the variables studied with serum CRP concentration (raw data) at preconception and throughout pregnancy.

Independent variable	Pre-conception		Weeks of pregnancy						In labor	
			8		20		32			
	B	p	B	p	B	p	B	p	B	p
Age, year	0.004 (0.052)	0.947	0.035 (0.159)	0.828	0.221 (0.164)	0.189	0.287 (0.455)	0.533	0.340 (0.357)	0.349
BMI (preconception, kg/m ²)	0.091 (0.046)	0.057	0.504 (0.141)	0.001	0.498 (0.136)	0.001	0.189 (0.347)	0.591	0.194 (0.288)	0.506
Weight gain from previous visit, kg			0.794 (0.365)	0.037	0.219 (0.523)	0.679	0.164 (0.610)	0.790		
Parity (one previous child)					0.456 (0.886)	0.611	-1.184 (2.844)	0.680	-1.136 (2.437)	0.645
Gestational age, week									-0.275 (1.147)	0.812
Total weight gain, kg									0.671 (0.319)	0.046
Fat mass variation, kg									0.165 (0.468)	0.727
Child sex (female vs. male)									-0.800 (1.983)	0.690
Birth weight, g									0.001 (0.003)	0.772
Placenta weight, g									0.003 (0.008)	0.695
Goodness of fit, F	1.937	0.159	5.702	0.003	6.123	0.001	0.189	0.942	1.183	0.349
R ² _{corrected} × 100	5.0		28.7		37.6		2.5		4.8	

B, regression coefficient as mean and standard error (SE).

minant of serum CRP concentration in normal pregnant women, with preconception BMI playing a predominant role during the first half of pregnancy, and the total weight gain being more important in labor.

The relationships between CRP and measurement of body weight and obesity are consistent with that of the in vivo release of IL-6 from adipose tissue (4). It is known that nearly one-quarter of IL-6 produced in vivo originates from adipose tissue and is thought to modify adipocyte glucose levels, lipid metabolism, and body weight (27). In conclusion, these data support the hypothesis of pregnancy as a proinflammatory condition related to weight gain.

Acknowledgements

Supported by funding from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT 89-0388) and the Instituto de Salud Carlos III, Red de Centros de Metabolismo y Nutrición (C03/08), Madrid, Spain. N.F. and M.T. were recipients of grants from the Generalitat de Catalunya (99-FI-790 and 01-FI-806, respectively). Reagents for CRP measurement were a gift from Biokit, S.A.

References

- Pickup JC, Crook MA. Is type 2 DM a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 1998;41:1241-8.
- Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997;40:1286-92.

- Festa A, D'Agostino Jr R, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome. *Circulation* 2000;102:42-7.
- Yudkin JS, Stehouwer CDA, Emeis JJ, Coppack SW. C-Reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:972-8.
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HW, Verheugt FW, Wolbink GJ, et al. C-Reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon? *Circulation* 1999;100:96-102.
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-Reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836-43.
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men [erratum appears in *N Engl J Med* 1997;337:356]. *N Engl J Med* 1997;336:973-9.
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation* 1998;97:425-8.
- Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 1998;98:731-3.
- Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16:5-15.
- Catalano PM. Obesity and pregnancy - the propagation of a vicious cycle? [editorial]. *J Clin Endocr Metab* 2003;88:3505-6.
- Retnakaran R, Hanley AJ, Raif N, Connelly PW, Sermer M, Zinman B. C-Reactive protein and gestational diabe-

- tes: the central role of maternal obesity. *J Clin Endocr Metab* 2003;88:3507-12.
14. Wolf M, Sandler L, Hsu K, Vossen-Smirnakis K, Ecker JL, Thadhani R. First-trimester C-reactive protein and subsequent gestational diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26:819-24.
 15. Tjoa ML, van Vugt JM, Go AT, Blankenstein MA, Oudejans CB, van Wijk IJ. Elevated C-reactive protein levels during first trimester of pregnancy are indicative of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Reprod Immunol* 2003;59:29-37.
 16. Wolf M, Kettyle E, Sandler L, Ecker JL, Roberts J, Thadhani R. Obesity and preeclampsia: the potential role of inflammation. *Obstet Gynecol* 2001;98:757-62.
 17. Rifai N, Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clin Chem* 2001;47:403-11.
 18. Simó JM, Joven J, Clivillé X, Sans T. Automated latex agglutination immunoassay of serum ferritin with a centrifugal analyzer. *Clin Chem* 1994;40:625-29.
 19. Murphy MM, Scott JM, McPartlin JM, Fernandez-Ballart JD. The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic acid supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in a longitudinal study. *Am J Clin Nutr* 2002;76:614-19.
 20. Ferré N, Camps J, Prats E, Girona J, Gómez F, Heras M, et al. Impaired vitamin E status in patients with parenchymal liver cirrhosis: relationships with lipoprotein compositional alterations, nutritional factors, and oxidative susceptibility of plasma. *Metabolism* 2002; 51:609-15.
 21. Martin RF. General Deming regression for estimating systematic bias and its confidence interval in method-comparison studies. *Clin Chem* 2000;46:100-4.
 22. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;i:307-10.
 23. Roberts WL, Sedrick R, Moulton L, Spencer A, Rifai N. Evaluation of four automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. *Clin Chem* 2000;46:461-8.
 24. Roberts WL, Moulton L, Law TC, Farrow G, Cooper-Anderson M, Savory J, Rifai N. Evaluation of nine automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. Part 2. *Clin Chem* 2001;47:418-25.
 25. Hamwi A, Vukovich T, Wagner O, Rumpold H, Spies R, Stich M, Langecker C. Evaluation of turbidimetric high-sensitivity C-reactive protein assays for cardiovascular risk estimation. *Clin Chem* 2001;47:2044-6.
 26. De BK, Smith LG, Owen WE, Roberts WL. Performance characteristics of an automated high-sensitivity C-reactive protein assay on the Dimension RXL analyzer. *Clin Chim Acta* 2002;323:151-5.
 27. Ledue TB, Rifai N. Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment. *Clin Chem* 2003;49:1258-71.
 28. Keski-Nisula L, Kirkinen P, Ollikainen M, Saarikoski S. C-Reactive protein in uncomplicated parturients delivered by cesarean section. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76:862-7.
 29. Hviilstom GB, Thorsen P, Jeune B, Bakketeig LS. C-Reactive protein: a serological marker for preterm delivery? *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002;81:424-9.
 30. Ramsay JE, Ferrell WR, Crawford L, Wallace MA, Greer IA, Sattar N. Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4231-7.

Received November 15, 2004, accepted January 12, 2005

Article 2

Diet and lifestyle are associated with serum C-reactive protein concentrations in a population-based study. J Lab Clin Med. 2005;145:41-46

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

Diet and lifestyle are associated with serum C-reactive protein concentrations in a population-based study

NURIA BERTRAN, JORDI CAMPS, JOAN FERNANDEZ-BALLART, VICTORIA ARIJA, NATALIA FERRE, MONICA TOUS, DOLORS SIMO, MICHELLE M. MURPHY, ELISABET VILELLA, and JORGE JOVEN

REUS, CATALONIA, SPAIN

C-reactive protein (CRP) has been proposed as an independent risk factor for cardiovascular disease. In this study we sought to investigate the association between several nutritional and lifestyle factors and serum CRP concentration in a population-based study. We studied 359 individuals (172 women, 187 men; age range 18–75 years) randomly selected from the town hall's registers and assessed their daily dietary intake using a 3-day estimated-food record. The median serum CRP concentration was 1.40 mg/L (range <0.10–47.48 mg/L; geometric mean 1.20 mg/L). We noted significant and independent direct associations between CRP and age, body-mass index, female sex, and serum triglyceride concentration. Bivariate analysis showed a significant inverse association between CRP and many nutrients (e.g., carbohydrates, proteins, lipids, thiamine, pyridoxine, tocopherol, and folate), but multiple-regression analysis indicated that only the effect of dietary folate intake was not dependent on other factors. Differences in folate intake did not produce changes in plasma homocysteine concentration, and we detected no negative correlation between dietary folate intake and log homocysteine ($r = .02$, $P = .711$). Strong positive correlations between the intake of folate and numerous other nutrients were found. This population-based study shows that a higher folate intake, in addition to other known constitutive and lifestyle factors, is significantly associated with a lower serum CRP concentration. (*J Lab Clin Med* 2005;145:41–6)

Abbreviations: ANOVA = analysis of variance; BMI = body-mass index; CRP = C-reactive protein; EDTA = ethylenediaminetetraacetate; HDL = high-density lipoprotein; hs-CRP = C-reactive protein measured with the use of high-sensitivity methods; LDL = low-density lipoprotein; MUFA = monounsaturated fatty acid; PUFA = polyunsaturated fatty acid

It is generally accepted that vascular inflammation plays a role in the development of atherosclerosis^{1,2} and that inflammation seems to be a predictive factor for the further development of acute coronary syndromes such as myocardial infarction and unstable angina.³ A feature of most forms of inflammation is the

increase in the circulating concentration of several plasma proteins known as acute-phase proteins,⁴ among them CRP. Substantial evidence supports a strong relationship between serum concentrations of hs-CRP and cardiovascular diseases and their complications.^{5–12} The Physicians Health Study showed that

From the Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan and the Unitat de Medicina Preventiva i Salut Pública, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Institut de Recerca en Ciències de la Salut.

Supported by grants 00/0252 and 00/0954 from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) of the Instituto de Salud Carlos III, Red de Centros de Metabolismo y Nutrición (C03/08), Madrid, Spain. Drs Ferre and Tous were recipients of grants 99-FI-790 and 02-FI-806, respectively, from the Generalitat de Catalunya.

Submitted for publication May 10, 2004; accepted for publication November 5, 2004.

Reprint requests: Jordi Camps, PhD, Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, C/. Sant Joan s/n, 43201-Reus, Catalonia, Spain; e-mail: jcamp@grupsagessa.com.

0022-2143/\$ – see front matter

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.lab.2004.11.002

participants in the highest quartile of hs-CRP distribution had a 2 times greater risk of stroke, a 3 times greater risk of myocardial infarction or sudden cardiac death, and a 4 times greater higher risk of peripheral-artery disease.^{5,6} Many other studies support the hypothesis that baseline CRP concentration is an independent risk factor of future cardiovascular events among apparently healthy individuals.¹³ A recent study demonstrated that hs-CRP is a stronger predictor of cardiovascular events than LDL cholesterol concentration, and that adds prognostic information to the data provided by the conventional risk factors.¹² We have studied the effect of several nutritional and lifestyle factors on serum CRP concentration in a population-based study.

METHODS

Study population. A representative sample of 359 subjects from 2 Catalanian villages (172 women, 187 men) was randomly selected from the town halls' population registers (mean age 42 years old, range 19–75 years). All the participants were of white-Mediterranean ethnic origin. The sex and age distributions of the subjects selected were in accordance with those of the population registers. We sent 784 subjects, selected randomly, a letter informing them about the study, then contacted them by means of telephone and asked whether wanted to participate. In 15.8% of cases, the letter was sent in errors (eg, subject deceased, wrong address), and 5.1% of addressees were excluded because of dementia, use of folate-antagonist medication, the use of folate or vitamin B₆/B₁₂ supplements, or pregnancy. Once these subjects were excluded, 79.1% were eligible for inclusion. Of these, 31.5% refused to participate and 2.6% could not make the appointment. Therefore 65.9% (n = 409) of the subjects deemed eligible participated. All of the selected subjects were invited to attend a clinical examination, to provide a fasting blood sample, and to complete a 3-day dietary record. After the examination and standard clinical laboratory tests, we excluded 50 participants in whom we suspected renal alterations, hepatic damage, or neoplasia. Use of medication was an exclusion criterion in the case interference by vitamins or drugs with homocysteine metabolism (eg, methotrexate, tuberculostatics, theophylline, vitamin B₆ antagonists). The study population did not consume vitamin supplements, and local foods are not fortified with vitamins in Spain. The study was approved by the Ethics Committees of the Hospital Universitari de Sant Joan and the Jordi Gol Foundation. All subjects gave their full informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Methods of dietary assessment. We assessed dietary intake using a 3-day estimated-food record.¹⁴ Subjects were instructed to record all food and beverage consumption (including snacks) over 2 nonconsecutive weekdays and 1 weekend day. Quantities were expressed in household measures. The food record was checked by the study's dietitian, who verified and classified the quantities and types of food recorded. Portion sizes were confirmed with photographic mod-

els depicting a variety of standard household measures. Each of the records was codified by the dietitian. This was a record of real food-and-beverage intake, not a food-frequency questionnaire, and the subjects registered what they ate rather than estimate their usual eating habits. The French Food Composition Table,¹⁵ complemented by the Spanish Food Composition Table,¹⁶ was used to calculate daily nutrient intake.

Biochemical measurements. We obtained blood samples while subjects fasted, collecting specimens into potassium EDTA-containing tubes for homocysteine determinations or into tubes with no anticoagulants added for the other biochemical tests. One week elapsed between recording of food intake and blood sampling. The serum concentration of hs-CRP was measured with the use of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (Quantex hs-CRP kit; Biokit, Barcelona, Spain) with a limit of detection of 0.10 mg/L. Coefficients of variation were less than 2% (intraassay) and less than 4% (interassay). HDL-cholesterol concentration was analyzed by a homogeneous method (ITC Diagnostics, Barcelona, Spain). Serum cholesterol and triglycerides were assessed with the use of standard techniques (ITC Diagnostics). LDL cholesterol was estimated with the use of Friedewald's equation.¹⁷ We measured plasma homocysteine concentration using a fluorescence polarization immunoassay (Abbott Diagnostics, Abbott Park, Ill).

Statistical analysis. We used the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilks methods to determine whether the variables were normally distributed. To check differences between CRP quartiles on the variables studied, we used ANOVA or the Kruskal-Wallis method followed by the Mann-Whitney U test, corrected for multiple comparisons when appropriate. To verify the association between CRP and the other variables, we fitted a multiple-linear regression model. This analysis was performed in 2 phases. In the first, we forced the inclusion into the model of factors previously reported to be related to CRP that were also significant in our data (Table I) such as age, smoking, BMI, and triglyceride concentrations. We also included pyridoxine because a significant inverse association has been reported between circulating vitamin B₆ and CRP.¹⁸ Although sex was not significant, it was also included. In the second phase, we determined which nutrients had an independent relationship with CRP, of all the nutrients previously shown to be related (Table I), with the use of stepwise methods of selecting variables. We also forced the introduction of energy intake into the model (a standard procedure to separate the effect of the total amount eaten from the amount of each specific nutrient). CRP concentrations were log-transformed (natural logarithms) before the application of the model. To estimate the degree of change produced in serum CRP concentration by modifications of the independent variable value, we calculated the antilogarithm of the B regression coefficient: $Average\ percent\ change = (antilog_e B - 1) \times 100$. For calculation purposes, we assigned CRP concentrations below the assay's limit of detection the value of 0.10 mg/L. Statistical analyses were performed with the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 11.5 (SPSS Inc., Chicago, Ill).

Table 1. Nutritional, lifestyle, and biochemical variables classified according to quartiles of serum CRP concentration

Variables	First quartile (<0.1–0.44 mg/L)	Second quartile (0.45–1.38 mg/L)	Third quartile (1.40–3.12 mg/L)	Fourth quartile (3.13–47.48 mg/L)	P
Men (%)	56.2	54.4	51.1	46.7	.595
Age (Y)*	32.8 (12.3)	39.9 (14.6)	44.3 (13.9)	50.9 (14.5)	<.001
Age group (%)					
18–29	46.1	32.2	15.6	10.0	<.001
30–44	32.6	32.2	41.1	23.3	
45–54	15.7	18.9	18.9	30.0	
55–64	3.4	7.8	11.1	11.1	
≥ 65	2.2	8.9	13.3	25.6	
Pack-years (in smokers)*	8.7 (7.6)	14.0 (14.5)	18.3 (17.5)	22.0 (15.5)	.004
Alcohol intake (g/d)*	7.9 (11.8)	9.7 (17.9)	8.3 (14.8)	11.7 (20.9)	.421
Physical exercise in leisure time (% yes)	43.8	54.4	40.0	43.3	.233
BMI (kg/m ²)*	23.7 (3.3)	25.9 (3.9)	27.8 (4.2)	30.3 (6.1)	<.001
Energy and nutrient intake*					
Energy intake (Kcal/d)	2398 (710)	2347 (735)	2167 (590)	1992 (605)	<.001
Carbohydrates (g/d)	226.3 (75.6)	226.3 (84.4)	204.9 (70.9)	186.8 (69.4)	.001
Proteins (g/d)	99.4 (30.7)	95.7 (27.9)	90.4 (25.5)	83.8 (24.3)	.001
Total lipids (g/d)	114.1 (36.1)	107.1 (36.3)	100.5 (28.0)	90.8 (28.2)	<.001
Saturated fatty acids (g/d)	32.9 (11.9)	30.3 (12.7)	27.9 (9.9)	24.9 (9.8)	<.001
MUFA (g/d)	56.1 (18.4)	53.2 (18.1)	50.4 (14.9)	46.4 (14.7)	<.001
PUFA (g/d)	14.5 (7.9)	13.4 (6.5)	12.5 (5.2)	10.9 (4.1)	.001
Cholesterol (mg/d)	398.7 (170.2)	378.5 (154.1)	371.7 (139.5)	335.9 (127.6)	.041
β-carotene (μg/d)	3864 (3450)	3225 (2711)	2739 (2287)	2897 (2615)	.038
Retinol (μg/d)	372.3 (420.1)	300.2 (376.7)	361.8 (599.9)	312.4 (583.9)	.723
Thiamine (mg/d)	1.54 (0.56)	1.50 (0.52)	1.35 (0.40)	1.20 (0.38)	<.001
Riboflavin (mg/d)	1.87 (0.56)	1.83 (0.58)	4.07 (22.15)	1.58 (0.49)	.399
Pyridoxine (mg/d)	2.05 (0.69)	1.96 (0.65)	1.81 (0.64)	1.71 (0.54)	.002
Cobalamin (μg/d)	5.57 (4.19)	6.41 (6.20)	5.51 (3.72)	5.56 (4.63)	.534
Ascorbate (mg/d)	115.2 (79.1)	97.6 (74.5)	92.8 (64.0)	99.8 (59.8)	.163
Tocopherol (mg/d)	13.9 (7.3)	12.5 (5.9)	12.1 (4.9)	10.6 (3.8)	.002
Folate (μg/d)	323.3 (126.9)	294.0 (107.9)	275.3 (100.3)	270.6 (92.4)	.005
Biochemical measures*					
Cholesterol (mmol/L)	4.86 (0.89)	5.20 (0.96)	5.41 (1.06)	5.65 (0.96)	<.001
Triglycerides (mmol/L)	1.01 (0.53)	1.19 (0.65)	1.49 (0.90)	1.66 (1.48)	<.001
HDL cholesterol (mmol/L)	1.62 (0.41)	1.53 (0.37)	1.50 (0.37)	1.49 (0.38)	.103
LDL cholesterol (mmol/L)	2.79 (0.77)	3.13 (0.86)	3.23 (0.90)	3.40 (0.86)	<.001
Homocysteine (μmol/L)	9.41 (3.71)	9.17 (2.73)	9.26 (3.59)	9.12 (2.32)	.937

*Quantitative data presented as mean (SD).

Statistical analysis was conducted with the use of ANOVA or the Mann-Whitney U test corrected for multiple comparisons.

RESULTS

Population description. Of the participants, 140 (39.0%) reported that they were current consumers of alcoholic beverages. Twenty-six other participants (7.2%) reported that they had stopped drinking alcohol between 1 and 38 years ago (4 had not consumed alcohol for 1 year, 12 had not consumed alcohol for 2–10 years, and 10 had abstained for >10 years), and they were therefore considered nondrinkers. Among the previous consumers of alcohol, 4 reported having drunk more than 80 g/day. One-hundred eight participants (30.1%) reported current cigarette smoking. Seventy-eight others (21.7%) reported that they had stopped smoking between 1 and 40 years ago (1 individual had

stopped a year ago, 34 had stopped 2–10 years ago, and 43 had stopped >10 years ago), and were considered as nonsmokers. Among the ex-smokers, 21 reported having smoked more than 20 cigarettes a day. The prevalence of current cigarette smoking was higher among the younger subjects (44% of those aged 18–29 years, 44.8% of those aged 30–44 years, 21.3% of those aged 45–54 years, 16.7% of those aged 55–64 years, and 8.9% of those aged 65–75 years; $P < .001$). Fifty-four women were menopausal, but just 7 took hormone-replacement therapy.

Serum CRP measurements. Serum CRP was detectable in 341 of the 359 participants (95.0%). A frequency histogram of CRP concentrations in our popu-

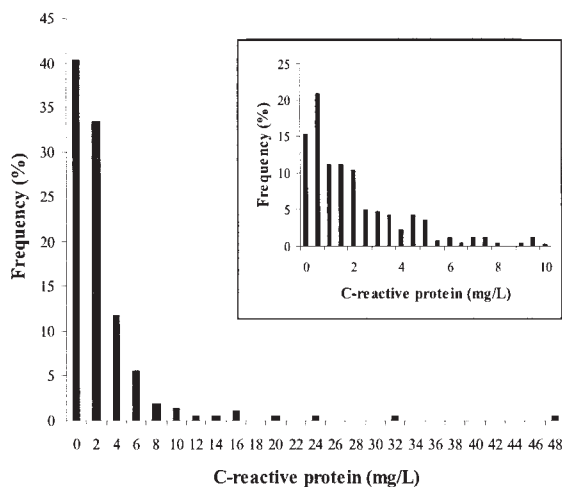


Fig 1. Histogram of frequency distributions of serum CRP concentrations in our study population ($n = 359$). The *insert* represents the frequency distributions in the participants with CRP of 10 mg/L or less ($n = 346$).

lation is shown in Fig 1; the distribution was highly skewed. The median CRP was 1.40 mg/L (range <0.10–47.48 mg/L; geometric mean 1.20 mg/L). Thirteen participants (3.6 %) had serum CRP concentrations of 10 mg/L or greater, reflecting an active infectious or inflammatory process.

Relationship between CRP and nutritional and lifestyle factors. The results of the nutritional and lifestyle assessment and the biochemical measurements classified according to quartiles of CRP are shown in Table I. Older age, increased BMI, number of pack-years of smoking, and higher serum cholesterol, LDL cholesterol, and serum triglyceride concentration were associated with significantly higher percentages of subjects with CRP concentrations in the highest quartiles. Lower total energy intake was significantly associated with higher CRP values. On bivariate analysis, many nutrients were found to be related to CRP concentration. Lower daily intake of carbohydrates, proteins, and lipids, as well as thiamine, pyridoxine, tocopherol, and folate, were associated with higher serum CRP concentrations.

The combined effects of all the nutritional and biochemical variables on CRP are shown in Table II. When a multiple-regression model was used, only sex, age, BMI, serum triglyceride concentration, and folate intake showed significant and independent associations with CRP. As is shown in Table II, women's serum CRP concentrations were, on average, 29.0 % greater than men's. Being 1 year older was associated, on average, with a 2.2 % higher serum CRP concentration,

Table II. Association of nutritional, lifestyle, and biochemical variables with serum CRP concentration

Independent variables	B	Effect (%)*	P
Man vs woman	-.341 (.147)	-29.0	.021
Age (yr)	.021 (.005)	2.2	<.001
Smoking (Y/N)	.018 (.005)	1.8	.895
BMI (kg/m ²)	.084 (.013)	8.8	<.001
Folate intake (100 µg/d)	-.217 (.065)	-19.5	.001
Triglycerides (mmol/L)	.213 (.063)	23.5	.001
Energy intake (kcal/d)	.0001 (.0001)	0.0	.443
Pyridoxine (mg/d)	-.0004 (.147)	-0.01	.998

Goodness of fit: $F_{(8,350)} = 21.146$; $P < .001$; $R_{corrected}^2 = .310$. B-regression coefficient, expressed as mean (SEM).

*Average percent change produced in serum CRP concentration by the increase in 1 unit of the independent variable value. Multiple-regression analysis introducing variables as described in the Methods section.

and having 1 unit more BMI and serum triglyceride concentration were associated with, on average 8.8 % and 23.5 % higher serum CRP concentrations, respectively. However, a higher dietary folate intake was related to a lower CRP concentration: 100 µg/day more was associated with, on average, 19.5% less CRP. We also conducted analyses in which we excluded participants with serum CRP concentrations of 10 mg/L or more and obtained nearly identical results (data not shown).

We detected no negative correlation between dietary folate intake and log homocysteine ($r = .02$, $P = .711$). The relationship between the intake of folate and of other nutrients is shown in Table III. Strong positive correlations between the intake of folate and numerous other nutrients are evident.

DISCUSSION

This study shows that the frequency distributions, median, and ranges of CRP concentrations in our population from Southern Europe are similar to those previously described for other white populations from Northern Europe and the United States.^{4,19} We also confirmed previous findings concerning the association of serum CRP concentration with several variables related to lifestyle.^{4,20–23} Although we did not confirm that moderate alcohol consumption reduces the concentration of circulating CRP,^{24,25} our results support the findings of a recent study indicating a lack of relationship between alcohol intake and CRP concentration.²¹ We believe that the explanation for these discrepancies resides in the higher percentage of participants defined as alcohol consumers in the first study (~90%) compared with the latter study and our own (~40 %). Regular physical exercise has been proved to play a

Table III. Bivariate relationships between folate intake and other nutrients

Variable	<i>r</i> (n = 359)	<i>P</i>
Energy intake (Kcal/d)	.352	<.001
Proteins (g/d)	.377	<.001
Total lipids (g/d)	.364	<.001
MUFA (g/d)	.429	<.001
β-Carotene (μg/d)	.548	<.001
Ascorbate (mg/d)	.591	<.001
Thiamine (mg/d)	.427	<.001
Pyridoxine (mg/d)	.562	<.001
Cobalamin (μg/d)	.295	<.001

r = Pearson's correlation coefficient.

positive effect on endothelial function in patients with coronary-artery disease, but in our study it did not significantly affect CRP concentration.²⁶

In this study we extensively investigated the relationship of nutritional factors with serum CRP concentration. To date, little information is available on the subject. Recently Friso et al¹⁸ observed a negative association between plasma pyridoxal phosphate (the active form of pyridoxine) and serum CRP in participants from the Framingham Heart Study. Our results from bivariate analysis show that higher CRP concentrations were associated with lower intake of many nutrients (eg, carbohydrates, proteins, lipids, thiamine, pyridoxine, tocopherol, folate). However, most of these associations were lost in the multivariate analysis, indicating that they were a consequence of other factors, very likely age and sex. We cannot exclude the possibility that socioeconomic status also influences CRP concentration because this parameter is related to nutritional intake.²⁷ However, a significant correlation of folate intake with CRP persisted after adjustment in a significant and independent inverse relationship.

This positive association of higher dietary folate intake with lower CRP concentration was found in generally healthy and adequately nourished subjects. Investigation of the molecular mechanisms underlying the effects of folate intake on CRP might be an interesting subject for further research. Our findings suggest that these effects are not related to changes in plasma homocysteine concentration. The findings of previous studies have suggested that adequate folate status plays a role in the improvement of endothelial function and the prevention of cardiovascular disease, and they also suggest that some of these effects may be independent of homocysteine concentration.^{28,29} Folate appears to improve endothelial function, not only through the activation of the methionine cycle but also through suppression of superoxide production and enhancement of nitric oxide generation.²⁹ That the lack of correlation

between folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations is not surprising in healthy populations must also be taken into account. Intervention trials involving fixed amounts of dietary folate have shown that although the correlation between synthetic folic-acid intake and plasma folate and homocysteine concentrations is high, the correlation between naturally occurring dietary folates and plasma folate concentration is low.³⁰ Our study was not an intervention study involving fixed amounts of folate from fixed sources, rather, we estimated folate intake from a variety of sources.

We observed that folate intake is highly associated with the intake of several vitamins and other nutrients. Therefore the negative association between folate intake and CRP that we observed in this study may not to reflect a totally independent effect of folate; rather, it may be a result of the combined effect of folates and the other nutrients related to it. Another possibility is that the observed effect is simply the result of the simultaneous intake of other nutrients and that folate intake is a marker of the effect. The folates ingested by this population were mainly derived from 3 major food groups: 30% from vegetables, 17% from cereals, and 16% from fruits. These results are in agreement with those of a recent study showing that frequent fruit and vegetable intake is associated with lower CRP concentrations in the elderly.³¹ These foods are also rich sources of other vitamins and minerals whose effects on CRP are not known. Therefore we can interpret folate intake as a marker of a dietary pattern that affects CRP concentration.

In summary, this population-based study shows that higher folate intake, in addition to other known constitutive and lifestyle factors, is significantly associated with lower serum CRP concentration.

Reagents for CRP measurement were a generous gift of Biokit SA.

REFERENCES

1. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–26.
2. Whicher J, Biasucci L, Rifai N. Inflammation, the acute phase response and atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:495–503.
3. De Ferranti S, Rifai N. C-reactive protein and cardiovascular disease: a review of risk prediction and interventions. *Clin Chim Acta* 2002;317:1–15.
4. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003;111:1805–11.
5. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *New Engl J Med* 1997;336:973–9.
6. Albert CM, Ma J, Rifai N, Stampfer MJ, Ridker PM. Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation* 2002;105:2595–9.

7. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation* 1998;97:425-8.
8. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836-43.
9. Hashimoto H, Kitagawa K, Hougaku H, Shimizu Y, Sakaguchi M, Nagai Y, et al. C-reactive protein is an independent predictor of the rate of increase in early carotid atherosclerosis. *Circulation* 2002;104:63-7.
10. Rettersol L, Eikvar L, Bohn M, Bakken A, Erikssen J, Berg K. C-reactive protein predicts death in patients with previous premature myocardial infarction: a 10 year follow-up study. *Atherosclerosis* 2002;160:433-40.
11. Ford ES, Giles WH. Serum C-reactive protein and self-reported stroke. Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1052-6.
12. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-65.
13. Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med* 2002;252:283-94.
14. Thompson FE, Byers T. Dietary assessment resource manual. *J Nutr* 1994;124 (suppl 11):245S-317S.
15. Favier JC, Ireland-Ripert J, Toque C, Feinberg M. Répertoire général des aliments. Table de composition. Paris: TEC & DOC Lavoisier-INRA; 1997.
16. Mataix J. Tabla de composición de alimentos española. Granada, Spain: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Granada; 1995.
17. Matas C, Cabré M, La Ville A, Prats E, Joven J, Turner PR, et al. Limitations of the Friedewald formula for estimating low-density lipoprotein cholesterol in alcoholics with liver disease. *Clin Chem* 1994;40:404-6.
18. Friso S, Jacques PF, Wilson PW, Rosenberg IH, Selhub J. Low circulating vitamin B₆ is associated with elevation of the inflammation marker C-reactive protein independently of plasma homocysteine levels. *Circulation* 2001;103:2788-91.
19. Imhof A, Fröhlich M, Loewel H, Helbecque N, Woodward M, Amouyel P, et al. Distributions of C-reactive protein measured by high-sensitivity assays in apparently healthy men and women from different populations in Europe. *Clin Chem* 2003;49:669-72.
20. Fröhlich M, Imhof A, Berg G, Hutchinson WL, Pepys MB, Boeing H, et al. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2000;23:1835-9.
21. Saito M, Ishimitsu T, Minami J, Ono H, Ohru M, Matsuoka H. Relations of plasma high-sensitivity C-reactive protein to traditional cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 2003;167:73-9.
22. Tracy RP, Psaty BM, Bovill EG, Cushman M, Cornell ES, Kuller LH. Lifetime smoking exposure affects the association of C-reactive protein with cardiovascular disease risk factors and subclinical disease in healthy elderly subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2167-76.
23. Bazzano LA, He J, Muntner P, Vupputuri S, Whelton PK. Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the United States. *Ann Intern Med* 2003;138:891-7.
24. Imhof A, Froelich M, Brenner H, Boeing H, Pepys MB, Koenig W, et al. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet* 2001;357:763-7.
25. Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM. Alcohol consumption and plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 2003;107:443-7.
26. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Krankel N, Shu Y, et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2003;107:3152-8.
27. Owen N, Poulton T, Hay FC, Mohamed-Ali V, Steptoe A. Socioeconomic status, C-reactive protein, immune factors, and responses to acute mental stress. *Brain Behav Immun* 2003;17:286-95.
28. Verhaar MC, Stroes E, Rabelink TJ. Foliates and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:6-13.
29. Das UN. Folic acid says NO to vascular disease. *Nutrition* 2003;19:686-92.
30. Cuskelly GJ, McNulty H, Scott JM. Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: implications for prevention of neural tube defects. *Lancet* 1996;347:657-9.
31. Gao X, Bermúdez OI, Tucker KL. Plasma C-reactive protein and homocysteine concentrations are related to frequent fruit and vegetable intake in Hispanic and Non-Hispanic white elders. *J Nutr* 2004;134:913-8.

Article 3

The role of circulating monocyte chemoattractant protein-1 as a marker of hepatic inflammation in patients with chronic liver disease.
Clin Biochem. 2005;38:1138-1140

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007



The role of circulating monocyte chemoattractant protein-1 as a marker of hepatic inflammation in patients with chronic liver disease

Judit Marsillach^a, Núria Bertran^a, Jordi Camps^{a,*}, Natàlia Ferré^b, Francesc Riu^a, Mònica Tous^a,
Blai Coll^{a,c}, Carlos Alonso-Villaverde^c, Jorge Joven^a

^a Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, Institut de Recerca en Ciències de la Salut, C/ Sant Joan s/n, 43201 Reus, Spain

^b DNA Unit, Centre de Diagnòstic Biomèdic, IDIBAPS, Hospital Clínic Universitari, C/ Villarroel 170, 08036-Barcelona, Spain

^c Department of Internal Medicine, Hospital Universitari de Sant Joan, Institut de Recerca en Ciències de la Salut, C/ Sant Joan s/n, 43201 Reus, Spain

Received 3 June 2005; received in revised form 1 September 2005; accepted 8 September 2005

Available online 20 October 2005

Abstract

We investigated the relationships between plasma monocyte chemoattractant protein-1, serum C-reactive protein, and the degree of hepatic inflammation in patients with chronic liver disease.

Monocyte chemoattractant protein-1 concentration was correlated with the histological hepatic inflammation (estimated by the Knodell index) and with standard liver function tests ($P < 0.01$). C-reactive protein was not correlated with any of the variables studied.

These results underline the role of monocyte chemoattractant protein-1 in the pathogenesis of liver impairment and suggest that this chemokine may be a reliable marker of inflammation in hepatic derangements.

© 2005 The Canadian Society of Clinical Chemists. All rights reserved.

Keywords: C-reactive protein; Cirrhosis; Hepatitis; Monocyte chemoattractant protein-1

Introduction

Chronic liver disease is a clinical term that includes a group of highly complex derangements involving several biochemical and physiological mechanisms and multiple cellular targets. One of the key processes in the onset and development of chronic liver diseases is an intense leukocytic infiltration into the liver, causing hepatic inflammation [1]. Leukocyte recruitment from the circulation requires the synthesis and release of chemokines by cells localized at sites of inflammation, where chemokines activate specific subsets of leukocytes to undergo migration into tissues. The monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is a member of the β (C–C) chemokine family, secreted by a variety of cells as a response to several inflammatory stimuli, and that activates and attracts monocytes/macrophages [2]. Furthermore, plasma MCP-1 concentrations are increased in patients with alcoholic hepatitis or cirrhosis [1,2] and in patients with hepatitis C [3].

One of the multiple consequences of pro-inflammatory cytokine release is the stimulation of the synthesis of acute

phase proteins. C-reactive protein (CRP) is probably the most relevant among these proteins; its measurement helps to differentiate inflammatory from non-inflammatory conditions and has recently found widespread application as a predictor of cardiovascular events [4]. It has been demonstrated that CRP increases MCP-1 release by cultured endothelial cells [5].

A considerable amount of research is focused on investigating the reliability of new non-invasive, serological markers of liver damage. There are no data available on the relationships between changes in the circulating concentrations of MCP-1 or CRP and the degree of hepatic histological inflammation despite the potential relevance of this information. The present study was undertaken to investigate this relationship in a group of patients with chronic liver disease.

Materials and methods

Study population and sampling

The study was performed in 110 patients recruited from those admitted to the Hospital Universitari de Sant Joan for

* Corresponding author. Fax: +34 977 312569.

E-mail address: jcamps@grupsaagessa.com (J. Camps).

a liver biopsy as requested by their physician. Their histological diagnosis included minimal liver disease (steatosis or minimal inflammation) in 21 patients (18 men, 3 women; age 35 ± 8 years), chronic hepatitis in 79 patients (53 men, 26 women; age 44 ± 11 years), and liver cirrhosis in 10 patients (7 men, 3 women; age 61 ± 8 years). The etiology of the disease was hepatitis C virus infection in 79 patients (72%), alcoholism in 20 patients (18%), and combined in 11 patients (10%). The control group consisted of 377 healthy volunteers (190 men, 187 women, age 42 ± 15 years) participating in an epidemiological study as described previously [6]. This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitari de Sant Joan.

Laboratory measurements

The degree of hepatic inflammation was determined in all the biopsies by the Knodell activity index [7]. This index is divided into four scored subindices: subindex I evaluates the periportal alterations including bridging necrosis (ranges between 0 and 10); subindex II is related to intralobular degeneration and focal necrosis (ranges between 0 and 4); subindex III estimates the degree of portal inflammation (ranges between 0 and 4); and subindex IV evaluates the presence and degree of fibrosis (ranges between 0 and 4). The total Knodell index was calculated as the sum of all the subindices (ranges between 0 and 22). Serum CRP concentrations were measured by a turbidimetric immunoassay (Biokit, Barcelona, Spain). EDTA-plasma MCP-1 concentrations were measured by ELISA (Peprotech, London, UK). Serum alanine aminotransferase, gamma-glutamyl transferase, and alkaline phosphatase activities, and albumin and total bilirubin concentrations were measured by reagents from Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA).

Statistical analysis

Differences between groups were analyzed by ANOVA. Spearman's ρ was used to evaluate the degree of association

between two variables. A multiple regression model was fit to verify the association between the total Knodell index and the measured biochemical variables. The diagnostic accuracy for the different tests was analyzed by receiver-operating characteristics (ROC) plots [8] by measuring the area-under-the-curve (AUC). Since most of the measured variables presented with non-Gaussian distributions, results are presented as medians and 95% confidence intervals (CI). Statistical analyses were performed with the SPSS 12.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

As expected, patients with liver disease had significant ($P < 0.001$) increases in the serum activities of standard liver enzymes and bilirubin concentrations and a decrease in serum albumin concentration. These changes were related to the severity of their disease (Table 1). These changes were associated with a concomitant increase in plasma MCP-1 concentration ($P < 0.001$). However, there were not any significant changes in serum CRP levels ($P = 0.430$). The total Knodell index and the different subindices showed a progressive increase ($P < 0.001$) in the patient groups, except for subindex II ($P = 0.177$). Plasma MCP-1 concentration was significantly correlated with the total Knodell index ($\rho = 0.29$, $P = 0.013$; Fig. 1) and with subindices I, III, and IV ($\rho = 0.25$, $P = 0.037$; $\rho = 0.27$, $P = 0.023$; $\rho = 0.30$, $P = 0.010$, respectively). MCP-1 also showed significant correlations with serum gamma glutamyl transferase activity ($\rho = 0.32$, $P = 0.001$) and with serum bilirubin concentration ($\rho = 0.25$, $P = 0.009$). Serum CRP was not significantly correlated with any of the parameters studied. When the multiple regression analysis was performed, only albumin ($P = 0.007$), alanine aminotransferase ($P = 0.024$), and MCP-1 ($P = 0.019$) showed significant and independent associations with the total Knodell index.

ROC analysis showed that the diagnostic accuracy of MCP-1 measurement was similar to that of the alanine aminotransferase activity [AUC: 0.94 (0.92–0.96) and 0.95 (0.92–0.98), respectively], and higher than that of the other

Table 1
 Results of the biochemical and histological variables in all the groups studied

Parameter	Control group (n = 377)	Minimal changes (n = 21)	Chronic hepatitis (n = 79)	Liver cirrhosis (n = 10)	P (ANOVA)
MCP-1 (ng/l)	49.7 (31.9–135.8)	103.0 (53.8–146.6) ^d	111.4 (60.8–188.8) ^f	122.5 (50.9–195.6) ^h	<0.001
CRP (mg/l)	1.39 (0.20–9.38)	1.19 (0.48–4.57)	1.05 (0.47–13.23)	0.76 (0.48–2.79)	0.430
ALT (μ kat/l)	0.33 (0.18–0.64)	0.98 (0.20–2.69) ^c	1.39 (0.37–5.80) ^c	0.92 (0.26–7.09) ^c	<0.001
GGT (μ kat/l)	0.22 (0.11–0.81)	0.82 (0.27–3.95) ^f	0.74 (0.15–2.39) ^f	0.80 (0.40–2.67) ^f	<0.001
ALP (μ kat/l)	2.61 (1.68–4.32)	3.16 (1.63–7.31) ^c	3.16 (1.60–6.50) ^c	3.86 (2.34–6.76) ^c	<0.001
Albumin (g/l)	42 (38–46)	48 (37–54) ^c	44 (38–51) ^c	38 (27–48) ^f	<0.001
Bilirubin (μ mol/l)	8.8 (3.9–20.4)	8.0 (3.3–26.6)	7.3 (3.6–21.9)	13.4 (5.5–30.4) ^b	<0.001
Knodell I	–	0 (0–1)	3 (0–6) ^d	6 (6–6) ^d	<0.001
Knodell II	–	1 (0–3)	1 (0–3)	2 (1–3)	0.177
Knodell III	–	0 (0–3)	3 (1–4) ^d	4 (4–4) ^d	<0.001
Knodell IV	–	0 (0–1)	1 (0–3) ^d	4 (4–4) ^d	<0.001
Total Knodell	–	1 (0–4)	8 (1–15) ^d	15 (15–16) ^d	<0.001

Results are expressed as medians and 95% CI (in parenthesis). ALT: alanine aminotransferase; GGT: gamma glutamyl transferase; ALP: alkaline phosphatase. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$, with respect to the control group; ^d $P < 0.001$, with respect to minimal changes.

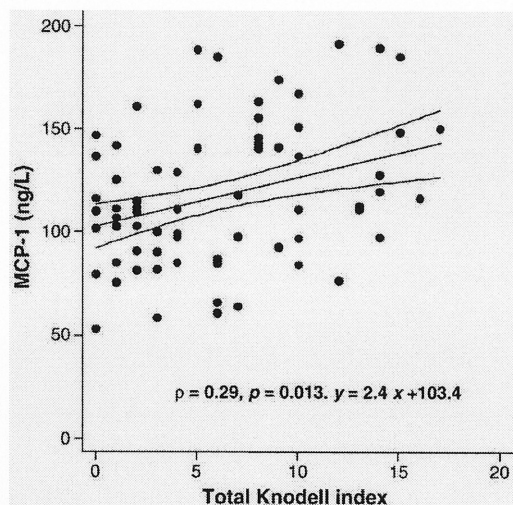


Fig. 1. Relationship between the total Knodell index and plasma MCP-1 concentration in patients with chronic liver disease. The continuous lines represent the regression line and the 95% confidence interval.

measured parameters [γ -glutamyl transferase: 0.87 (0.83–0.92); albumin: 0.69 (0.62–0.76); alkaline phosphatase: 0.68 (0.61–0.74); bilirubin: 0.58 (0.50–0.65); CRP: 0.54 (0.48–0.60)].

Discussion

Liver diseases are inflammatory processes associated with increased plasma concentrations of cytokines and chemokines. An enhanced expression of MCP-1 was observed in liver parenchymal cells at sites of inflammation in patients with alcoholic hepatitis [1,2], and MCP-1 concentrations were also found increased in the peripheral and the hepatic veins of these patients [9]. These results suggested that MCP-1 may play an important role in the stimulation of the inflammatory infiltrate, and probably, it might also have immunomodulatory effects, including enhanced expression of adhesion molecules in monocytes and promotion of pro-inflammatory cytokine synthesis, thus amplifying the inflammatory cascade [10]. However, it was not clear whether plasma MCP-1 concentrations were correlated with the severity of the liver disease. Our results show a significant relationship between MCP-1 and the histological degree of hepatic impairment measured by the Knodell index, in particular with the subindices that estimate inflammation and fibrosis. MCP-1 was also significantly associated with some biochemical markers of hepatic dysfunction.

Serum CRP concentrations, on the contrary, did not show any significant change related to the patients' diagnosis or to the histological or biochemical markers of liver impairment. Previous studies have shown different patterns of CRP alteration according to the type of liver disease. Thus, it has been reported to be increased in alcoholic hepatitis [3], unchanged in non-alcoholic steatohepatitis [11], and decreased in chronic hepatitis C [12]. Most of our patients had liver

disease secondary to hepatitis C virus infection, providing an explanation for the observed trend of decreased CRP concentrations.

In summary, the present study underlines the role of MCP-1 in the pathophysiology of liver impairment and suggests that preventing MCP-1 secretion or inhibiting its effects might be a useful approach for the research on new therapeutic tools. In addition, we suggest that MCP-1, and not CRP, may be a reliable marker of hepatic inflammation in chronic liver diseases.

Acknowledgments

This study was supported by the Red de Centros de Metabolismo y Nutrición (RCMN C03/08) and the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 00/0252 and FIS 03/0430) from the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. Judit Marsillach and Mònica Tous were recipients of grants from the Generalitat de Catalunya (FI 05/00068 and FI 02/00806, respectively). We thank Dr. Eduard Prats for his advice and Alberto Ameijide for his help with the statistical analysis.

References

- [1] Afford SC, Fisher NC, Neil DAH, et al. Distinct patterns of chemokine expression are associated with leukocyte recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J Pathol* 1998;186:82–9.
- [2] Devalaraja MN, McClain CJ, Barve S, Vaddi K, Hill DB. Increased monocyte MCP-1 production in acute alcoholic hepatitis. *Cytokine* 1999;11:875–81.
- [3] Panasiuk A, Prokopowicz D, Panasiuk B. Monocyte chemoattractant protein-1 and soluble adhesion molecules as possible prognostic markers of the efficacy of antiviral treatment in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2004;10:3639–42.
- [4] Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836–43.
- [5] Pasceri V, Chang J, Willerson JT, Yeh ETH. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 2001;103:2531–4.
- [6] Ferré N, Camps J, Fernandez-Ballart J, et al. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional and lifestyle factors in general population. *Clin Chem* 2003;49:1491–7.
- [7] Knodell RG, Ishak KG, Black WC, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431–5.
- [8] Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993;39:561–577.
- [9] Fisher NC, Neil DAH, Williams A, Adams DH. Serum concentrations and peripheral secretion of the beta chemokines monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1 α in alcoholic liver disease. *Gut* 1999;45:426–30.
- [10] Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 1992;148:2423–8.
- [11] Hui JM, Farrell GC, Kench JG, George J. High sensitivity C-reactive protein values do not reliably predict the severity of histological changes in NAFLD. *Hepatology* 2004;39:1458–9.
- [12] Kalabay L, Nemesánszky E, Csepregi A, et al. Paradoxical alteration of acute-phase protein levels in patients with chronic hepatitis C treated with IFN- α 2b. *Int Immunol* 2004;16:51–4.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

6. DISCUSSIÓ GENERAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

Al primer estudi es descriu l'avaluació d'un immunoassaig turbidimètric d'alta sensibilitat per a la determinació de PCR. Els resultats obtinguts són comparables als mètodes turbidimètrics d'alta sensibilitat descrits a la bibliografia i utilitzats en altres sistemes analítics (18,52,111-113). Pel que fa a la imprecisió aconseguida, en quasi totes les mostres i controls va ser de < 5%. La sensibilitat funcional va ser de 0.3 mg/L i la linealitat de la tècnica va ser excel·lent en tot el rang analític (de 0.3 – 30 mg/L). Es va poder descartar interferència analítica en mostres amb icterícia (bilirubina < ó = 175 micromol/L), hiperlipèmia (triglicèrids < ó = 5 mmol/L) i hemoglobina (< ó = 5g/L). El factor reumatoide fins 400 kU/L no va presentar interferències. Tampoc es va trobar interferència significativa amb les immunoglobulines monoclonals IgG, A, M fins a concentracions de 27, 20 i 18g/L respectivament.

Es va dur a terme un estudi de concordança amb el nefelòmetre Behring II, validat clínicament (18). Va haver-hi una bona correlació i les diferències entre els resultats dels dos mètodes no eren superiors al 10%.

El mètode analític avaluat va ser utilitzat per obtenir les dades de PCRas en les mostres de cada un dels estudis. En el primer estudi es va valorar l'evolució d'aquest paràmetre al llarg d'un embaràs normal. Diferents estudis (114-115) havien ja descrit la relació entre nivells de PCR del primer trimestre i l'aparició de preeclàmpsia i el naixement de nadons de baix pes. Estudis de Kaski-Nisula et al. (116) van associar nivells de PCR amb mares parteres que presentaven ruptura de membranes. També estava descrita (117) la relació entre valors elevats en plasma i naixement abans de termini. Amb aquestes dades obtingudes en estudis de tipus transversal, prenien encara més interès poder conèixer els canvis en la concentració de PCR durant l'embaràs normal i abans de la concepció i anar valorant els factors que poguessin influir en aquests canvis. Es va poder observar que el pes de la mare era el paràmetre determinant en dones amb embaràs normal. Així, té una importància fonamental l'índex de massa corporal abans de la concepció i durant els primers 4-5 mesos, i l'augment de pes és determinant en els valors de la PCR en el moment del part.

El segon estudi es va centrar a conèixer els valors de referència de PCR en una població adulta sana i representativa de l'àrea mediterrània. Es va expressar la distribució de freqüències, la mitjana i el rang dels valors. Això permet una comparació amb les dades d'altres poblacions estudiades del nord d'Europa i dels EUA, així com l'adaptació dels protocols establerts en l'estratificació de pacients amb risc de patir malalties cardiovasculars. El coneixement dels hàbits pel que fa a l'alimentació, tabac, exercici, alcohol i d'altres, obtinguts amb un acurat seguiment d'aquesta població (118-123), va permetre associar la concentració de PCR amb tipus d'aliments i estil de vida i fer-ne una base de recomanacions (50,60).

Aquest estudi no va confirmar que l'alcohol, en poca quantitat, pogués disminuir les concentracions de PCR (103). Per altra part, d'una anàlisi bivariant es dedueix una forta associació entre la disminució dels principals nutrients (carbohidrats, proteïnes, lípids, tiamina, folat, pididoxina, tocoferol) i elevacions de PCR. En una anàlisi multivariant es va perdre l'associació, probablement perquè eren conseqüència d'altres factors com edat i sexe. Amb tot es va mantenir una relació inversa significativa entre la ingesta de folat i la PCR. Atès que la ingesta de folat està relacionada amb la ingesta d'altres nutrients i vitamines, el folat podria ser un marcador d'un tipus determinat d'alimentació. Els folats ingerits per la població deriven de tres grups majoritaris d'aliments: vegetals en un 30%, cereals en un 17% i 16% de fruita. Aquests resultats estarien d'acord amb estudis realitzats en gent gran que relacionen baixes concentracions de PCR i alimentació rica en fruita i vegetals (105).

En el tercer estudi la concentració de PCR, marcador d'inflamació, va ser estudiat en pacients amb malaltia hepàtica crònica. Es va valorar l'associació de la PCR amb l'estadi de la inflamació i es va comparar amb les concentracions de la proteïna MCP-1 com a molècula implicada a generar infiltrat inflamatori en el fetge (124-126). Els resultats de PCR no van mostrar canvis significatius segons el diagnòstic de la malaltia ni guarden relació amb l'evolució de la malaltia segons marcadors bioquímics i histològics. En estudis previs s'havien mostrat diferents patrons d'alteració de PCR segons el tipus de malaltia hepàtica. Està descrit que està augmentada en hepatitis alcohòlica, no canvia en esteatohepatitis no alcohòlica i disminueix en hepatitis C crònica (127-129). Els pacients de l'estudi tenen malaltia hepàtica secundària a l'hepatitis infecciosa per virus C; això aportaria una explicació a l'observació de la disminució de la concentració de PCR.

7. CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

- L'avaluació del PETIA de PCRas, va donar una sensibilitat funcional de 0.30 mg/L, amb variabilitat analítica comparable a la d'altres tècniques turbidimètriques i amb valors comparables a mètodes nefelomètrics. La lipèmia, icterícia i hemòlisi van tenir poca influència i el factor reumatoide i la presència de paraproteïna no van presentar interferències d'interès.
- S'ha determinat la concentració de PCR en població gestant. El pes de la mare va ser el principal determinant de la concentració sèrica de PCR en dones gestants normals. El BMI a la preconcepció va jugar un paper predominant durant la primera part de la gestació, i l'augment total de pes va ser el més important al moment del part.
- La distribució de freqüències dels valors, la mitjana i l'amplitud de valors de PCR en una població del sud d'Europa, àrea mediterrània, és similar a la descrita amb antelació en poblacions del nord d'Europa i en la població dels EUA.
- Es va confirmar que l'edat, el sexe, el BMI i la concentració plasmàtica de triglicèrids presenten fortes associacions amb la concentració sèrica de PCR. No hem confirmat l'associació descrita amb la ingesta d'alcohol.
- S'ha estudiat l'associació amb els hàbits de nutrició. L'anàlisi bivariant va trobar una associació entre les concentracions elevades de PCR i una baixa ingesta de nutrients: carbohidrats, proteïnes, lípids, tiamina, piridoxina, tocoferol i folats. Quasi totes les associacions es van perdre amb una anàlisi multivariant excepte l'associació amb la ingesta de folat. Es pot interpretar que la ingesta de folat és un marcador d'un patró de dieta que afecta a la concentració de PCR.
- En pacients amb malaltia hepàtica crònica, les concentracions de PCR no van guardar cap relació significativa amb el diagnòstic histològic o amb l'evolució de la malaltia hepàtica i altres marcadors bioquímics. L'estudi d'una quimiocina MCP-1 en plasma, sobreexpressada en les cèl·lules del parènquima hepàtic, permet trobar una relació significativa i el repte és actuar sobre ella amb fàrmacs que podrien frenar l'evolució de la malaltia.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

8. BIBLIOGRAFIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

1. Tillet W.S, Francis T, J. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med.*1930;52:561-571.
2. McLeod CM, Avery OT. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in blood. Its isolation and properties of the C-reactive protein. *J Exp Med.*1941;73:183-190.
3. Mark B. Pepys, Hirschfield G. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.*2003;111:1805-1812.
4. Srinivasan N, Rufino SD, Pepys MB, Wood SP, Blundell TL. A superfamily of proteins with the lectin fold. *Chemtracts-Biochem Mol Biol.*1996;6:149-64.
5. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein. *Adv. Immunol* 1983;34:141-212.
6. Osmand AP, Friedenson B, Gewurz H, Painter RH, Hofman T, Shelton E. Characterisation of C-reactive protein and the complement subcomponent C1q as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry (pentaxins). *Proc Natl Acad Sci USA.*1977;74:39-43.
7. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure.*1999;7:169-177.
8. Shrive AK, Cheetham GM, Holden D, Myles DAA, Turnell WG, Volanakis JE, Pepys MB, Bloomer AC, Greenhough TJ. Three-dimensional structure of human C-reactive protein. *Nature Struct Biology.*1996;3:346-354.
9. Agrawal A, Simpson MJ, Blak S, Carey MP, Samols D. A C-reactive protein mutant that does not bind to phosphocholine and pneumococcal C-polysaccharide. *J.Immunol.*2002;169:3217-3222.
10. Agrawal A, Shrive AK, Greenhough TJ, Volanakis JE. Topology and structure of the C1q binding site on C-reactive protein. *J.Immunol.*2001;166:3998-4004.
11. Hirschfield GM, Pepys MB. C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *Q.J.Med.*2003;96:793-807.
12. Kushner I. C-reactive protein in rheumatology. *Arthritis Rheum.*1991;34:1065-1068.
13. Robey FA, Liu T. Y. Limulin: a C-reactive protein from *Limulus polyphemus*. *J.Biol Chem.*1981;256:969-975.
14. Pepys MB, Baltz M, Gomer K, Davies AJS, Doenhoff M. Serum amyloid P-component in an acute-phase reactant in the mouse. *Nature.*197;278:259-261.
15. Pepys MB, Isolation of serum amyloid P component (protein SAP) in the mouse. *Immunology.*197;37:637-641.
16. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol.*1983;34:141-212.
17. Cook Mathew T, Hayball Peter J, Nowak Barbara F, Hayball Hohn D. The opsonising activity of a pentraxin-like protein-isolated from snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae) serum. *Developmental & Comparative Immunology.* 2005;8:703-712.

18. Ledue TB, Rifai N. Preanalytic and Analytic Sources of Variations in C- Reactive Protein Measurement: Implications for Cardiovascular Disease Risk Assessment. *Clin Chem* 2003;49:1258-71.
19. Pepys MB, Rowe F, Baltz ML. C-Reactive protein: binding to lipids and lipoproteins. *Int Rev Exp Pathol.*1985;27:83-111.
20. Valonakis JE, Wirtz KWA. Interaction of C-reactive proteïn with artificial phosphatidylcholine bilayers. *Nature.*1979;281:155-157.
21. Du Clos TW. C-reactive protein reacts with the U1 small nuclear ribonucleoprotein. *J.Immunol.*1989;143:2553-2559.
22. Pepys MB,Booth SE, Tennent GA, Butler PJG, Williams DG. Binding of pentraxins to different nuclear structures: C-reactive protein binds to small nuclear ribonucleoprotein particles, serum amyloid P component binds to chromatin and nucleoli. *Clin Exp Immunol.*1994;97:152-157.
23. Gershov D. Kim S, Brot N, Ekon KB. C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects de cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an anti-inflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med.*2000;192:1353-1363.
24. Steel DM,Whitehead AS. The major Acute reactans : C-reactive protein. *Immunol Today.*1994;15:81-88.
25. Du Closs TW. Function of C-reactive protein. *Ann Med.* 2000;32:274-278.
26. Faimboim Leonardo, Geffner Jorge. *Introducción a la Inmunologia.* Buenos Aires:Médica Panamericana.2005. 5ªEdicion. 504p.
27. Whitehead AS, Bruns GAP,Markham AF, Colten HR, Wodds DE. Isolation of human C-reactive protein complementary DNA and localization of the gene to chromosome 1.*Science.* 1983;221:69-71.
28. Mantzouranis EC, Downton SB, Whitehead AS. Edge MD,Bruns GAP,Colten HR,. Human serum amyloid P cDNA isolation, complete sequence of pre-serum amyloid P component and localization og de gene to chromosome 1. *J.Biol Chem.* 1985;260:7752-7756.
29. Hurlinam J, Thorbecke G, Hochwald G. The liver as de site of C-reactive protein formation. *J.Exp Med.*1966;123:365-378.
30. Murphy TM, Baum LL, Beaman KD. Extrahepatic transcription of human C-reactive protein. *J Exp Med.*1991;173:495-498.
31. Yasojima K.Schwab C. Mc Geer PL. Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease. *Brain.*2000;887:80-89.
32. Gould JM. Weiser JN. Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract. *Infect Immun.* 2001;69:1747-1754.
33. Yasojima K, Schwab C.Mc Geer EG, MC Geer PL. Generation of C-reactive protein and component components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* 2001;158:1039-1051.

34. Gould JM, Weiser JN. The inhibitory effect of C- reactive protein on bacterial phosphorylcholine platelet - activating factor receptor-mediated adherence is blocked by surfactant. *J Infect Dis.* 2002;186:361-371.
35. Mackiewicz A, Speroff T, Ganapathi MK, Kushner I. Effects of cytokine combinations on acute phase protein production in two human hepatoma cell lines. *J Immunol.* 1991;146:3032-3037.
36. Cha-Molstad H, Agrawal A, Zhang D, Samols D, Kushner I. The Rel family member P50 mediates cytokines - induced C- reactive protein expression by a novel mechanism. *J Immunol.* 2000;165:4592-4597.
37. Agrawal A, Cha Molstad H, Samols D, Kushner I. Transactivation of C-reactive protein by IL-6 requires synergistic interaction of CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta) and Rel p50. *J Immunol.* 2001;166:2378-2384.
38. Yue CC, Muller- Greven J, Dailey P, Lozanski G, Anderson V, Macintyre S. Identification of a C- reactive protein binding site in two hepatic carboxylesterases capable of retaining C-reactive protein within the endoplasmic reticulum. *J. Biol Chem.* 1996;271:2245-2250.
39. Kushner I, Feldman G. Control of the acute phase response. Demonstration of C-reactive protein synthesis and secretion by hepatocytes during acute inflammation in the rabbit. *J Exp Med.* 1978;148:466-477.
40. Bienvenu J, Whicher S T, Aguzzi F. Plasmatic proteins: C-reactive protein. 1996. Beckman Coulter. 17.05.
41. Pepys, MB, CRP or not CRP. That is the question. Editorial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25: 1091-1094.
42. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Jordan S. *Immunologia celular i molecular.* Edt Mc Graw-Hill Interamericana Elseiver 2004. 4t ed.
43. Lubert Stryer. *Biochemistry (Bioquímica).* Versió espanyola, Editorial Reverté. Barcelona. 1995. Tomo II. 4t ed.
44. Tresguerres JAF. *Fisiologia humana.* Edit Mc Grw - Hill Interamericana. 1999. 2ª ed. 1169p.
45. Libby P, MD, Ricker Paul. Inflammation and Atherosclerosis : Role of C-Reactive Protein in Risk Assesment. *A J of Med.* 2004;116:9-16.
46. Ricker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N.Engl J. Med.* 1997;336:973-979.
47. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflamm in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;342:836-843.
48. Köening W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, et al. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men; results from de MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Sytudy. 1984 to 1992. *Circulation.* 1999;99:237-242.
49. Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Hayes M, Sibershatz H, Massaro JM, et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack; the Framingham study. *Stroke.* 2001;32:2575-2579.

50. Albert CM, Ma J, Rifai N, Stampher MJ, Ricker PM. Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation*.2002;105:2595-2579.
51. Ricker PM, Stampher MJ, Rifai N. Novel risk factors of systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA*. 2001;285:2481-2485.
52. William L, Roberts, Linda Moulton, Terence C. Law, Genesis Farrow, Nader Rifai and al. Evaluation of nine automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications.Part2. *Clinical Chemistry*. 2001;47:3;418-425.
53. Elizabeth M, Macy, Timothy E. Hayes, and Russell P. Tracy. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications. *Clinical Chemistry*.1997;43:52-58.
54. Nader Rifai and Paul M.Ridker. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clin Chem*. 2001;47:403-411.
55. Rifai N, Ridker PM. Proposed cardiovascular risk assessment algorithm using high-sensitivity C-reactive protein and lipid screening. *Clin Chem*. 2001;47:28-30.
56. Tracy RP. Inflammation in cardiovascular disease. *Circulation*.1998;97:2000-2002.
57. Ross R. Atherosclerosis and inflammatory disease. *N Engl J Med*.1999;340:115-126.
58. Libby P. Ridker PM. Novel inflammatory markers of coronary risk. *Circulation*.1999;100:1148-1150.
59. Plutzky J. Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Am J Cardiol*. 2001;88:10K-15K.
60. Thomas A Pearson. George A Mensah, R Wayne Alexander, Jeffrey L. Anderson and al. Markers of inflammation and cardiovascular disease. *Circulation*. 2003;107:499-51.
61. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampher Mj,Allen J. Plasma concentrations of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men.*Lancet*.1998;351:88-92.
62. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation*. 2001;103:491-495.
63. Danesh J, Collins R, Appleby B, et al.Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leucocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA*.1998;279:1477-1482.
64. Danesh J, Whincup P,Walker M,et al. Low grade of inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ*. 2000;321:199-204.
65. Ridker PM, Haughie P. Prospective studies of C-reactive protein as a risk factor for cardiovascular disease. *J Investig Med*.1998;46:391-395.

66. Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, et al. Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study: Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol.* 1996;144:537-547.
67. Ridker PM, Buring JE, Shih J, et al. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation.* 1998;98:731-733.
68. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;342:836-843.
69. Tracy RP, Lemaitre RN, Psaty BM, et al. Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly: results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1121-1127.
70. Kop WJ, Gottdiener JS, Tangen CM, et al. Inflammation and coagulation factors in persons > 65 years of age with symptoms of depression but without evidence of myocardial ischemia. *Am J Cardiol.* 2002;89:419-424.
71. Tracy RP. Hemostatic and inflammatory markers as risk factors for coronary disease in the elderly. *Am J Geriatr Cardiol.* 2002;11:93-100.
72. Ridker PM, Rifai N, Rose L, et al. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2002;347:1557-1565.
73. Folsom AR, Aleksic N, Cateliner D, et al. C-reactive protein and incident coronary heart disease in the Atherosclerosis Risk in the Communities (ARIC) study. *Am Heart J.* 2002;144:233-238.
74. Ford ES, Giles WH. Serum C-reactive protein and self-reported stroke findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1052-1056.
75. Ford ES, Giles WH. Serum C-reactive protein and fibrinogen concentrations and self-reported angina pectoris and myocardial infarction: findings from National Health and Nutrition Examination Survey III. *J Clin Epidemiol.* 2000;53:95-102.
76. Albert CM, Ma J, Rifai N, et al. Prospective study of C-reactive protein, homocysteine and plasma lipids levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation.* 2002;105:2595-2599.
77. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, et al. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med.* 1999;106:506-512.
78. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for system atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein (a) and standard cholesterol screening, as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA.* 2001; 285: 2481-2485.
79. Mayumi Saito, Toshihiko, Junichi Minami, Hidehiko Ono, Masami Ohrai, Hiroaki Matsuoka. Relations of plasma high-sensitivity C-reactive protein to traditional cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis.* 2003;167:73-79.
80. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation.* 1998;97:2007-2011.

81. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation*.2001;103:1813-1818.
82. Rifai N, Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clin.Chemis*.2001; 47: 403-411.
83. Després JP, Marette A. Relation of components of insulin resistance syndrome to coronary disease risk. *Curre Opin Lipidol*.1994;5:274-289.
84. Després JP, Lamarche B, Mauriège P, et al. Hiperinsulinèmia as un independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl J Med*.1996;334:952-957.
85. Hotasmisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91.
86. Mohamed Ali V, Goodrick S, Ravessh A, Katz DR, Miles JM et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*.1997;82:4196-4200.
87. Albert KGMM, Gries FA, Jervell J. and al. A desktop guide for de management of non insulin-dependent diabetes mellitus: un update. *Diab Med*.1994;11:899-909.
88. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, et al.. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for helthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*.1999;100:1134-1146.
89. Margit Fröhlich, Armin Imhof, Gabriele Berg, Winston L. Hutchinson. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome. *Diabetes care*. 2000;23:1835-1839.
90. Folson AR, Pankow JS, Tracy RP et al. Association of C-reactive protein whit markers of prevalent atherosclerotic disease. *Am J Cardio*.2001;88:112-117.
91. Redberg RF, Rifai N, Gee L, et al. Lack of associations of C-reactive protein and coronary calcium by electron beam computed tomography in pospenopausal women: Implications for coronary artery disease scaening. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:39-43.
92. Hunt ME, O'Malley PG, Vernalis MN, et al. C-reactive protein is not associated with the presence or extent of calcified subclinical atherosclerosis. *Am Heart J*. 2001;141:206-210.
93. Tataru MC, Heinrich J, Junker R, et al. C-reactive protein and de severity of atherosclerosis in myocardial infarction patients with stable angina pectoris. *Eur Heart J*.2000;21:1000-1008.
94. Madsen T, Skou HA, Hansen VE, et al. C-reactive protein dietary n-3 fatty acids and the extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol*.2001;88:1139-1142.
95. Gronholdt ML, Sillesen H, Wiebe BM, et al. Increased acute phase reactants are associated with the levels of lipoproteins and increased carotid plaque volume. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001;21:227-234.
96. Jousilahti P, Saloma V, asi V, et al. The association of C-reactive protein, serum amyloid A fibrinogen with prevalent coronary heart disease - baseline findings of the PAIS project. *Atherosclerosis*. 2001;156:451-456.

97. Morrow DA, Rifai N, Antman EM, et al. C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponinT in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. *Thrombolysis in Myocardial Infarction. J Am Coll Cardiol.*1998;31:1460-1465.
98. Benamer H, Steg PG, Benessiano J et al. Comparison of the prognostic value of C-reactive protein and troponin I in patients with unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.*1998;82:845-850.
99. Rebuffi A, Quaranta G, Liuzzo G et al, Incremental prognostic value of serum levels of troponinT and C-reactive protein on admission in patients with unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.*1998;82:715-719.
100. Di Napoli M, Papa F, Boccola V. C- reactive protein in ischemic stroke: an independent prognostic factor. *Stroke.* 2001;32:917-924.
101. Di Napoli M, Papa F, Boccola V. Prognostic influence of increased C-reactive protein and fibrinogen levels in ischemic stroke. *Stroke.*2001;32:133-138.
102. Rossi E, Biassucci LM, Citterio F, et al. Risk of myocardial infarction and angina in patients with severe peripheral vascular disease: predictive role of C-reactive protein. *Circulation.*2002;105:800-803.
103. Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM. Alcohol Consumption and Plasma Concentration of C-reactive protein. *Circulation.*2003;107;443-447.
104. Bazzano LA, Je J, Muntner P, Vupputuri S, Welton PK. Relationship between Cigarette Smoking and Novel Risk Factors for cardiovascular Disease in the United States. *Ann Intern Med.* 2003;138:891-897.
105. Gao X, Bermudez OI, and Tucker KL. Plasma C-reactive protein and homocysteine concentrations are related to frequent fruit and vegetable intake in hispanic and non-hispanic white elders. *The J Nutr.* 2004; 134:913-918.
106. Steven E. Nissen, E. Murat Tuzcu, Paul Schoenhagen, and al. Statin therapy, LDL Cholesterol, C-reactive Protein and Coronary Artery Disease. *N Eng J Med.* 2005;352:29-38.
107. Paul M. Ridker, Christopher P. Cannon, David Morow, Nader Rifai and al. C-Reactive protein Levels and Outcomes after Statin Therapy. *N Engl J Med.* 2005;352:20-28.
108. Albert MA, Danielson E, Rifai N, et al. Effect of statin therapy of C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation(PRINCE) a randomized trial and cohort study. *JAMA.* 2001;286:64-70.
109. Macy E, Hayes T, Tracy R,. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference interval and epidemiological applications: part 2. *Clin Chem.*1997;43:52-58.
110. Ockene IS, Matthews Ce, Rifai N et al. Variability and classification accuracy of serial high-sensitivity C-reactive protein measurements in healthy adults. *Clin Chem.*2001; 47:444-450.
111. Roberts WL, Sedrick R, Moulton L, Spencer A, Rifai N. Evaluation of four automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. *Clin Chem* 2000;46:461-468.
112. Hamwi A, Vukovick T, Wagner O, Rumpold H, Spies R, Stich M, Langecker C, Evaluation of turbidimetric high sensitivity C-reactive protein assays for cardiovascular risk estimation. *Clin Chem.*2001;47:2044-2046.

- 113.** De BK, Smith LG, Owen WE, Roberts WL. Performance characteristics of an automated high-sensitivity C-reactive protein assay on the Dimension RXL analyzer. *Clin Chim Acta.*2002;323:151-155.
- 114.** Tjoa ML, van Vugt JM, Go AT, Blankenstein MA, Oudejans CB, van Wijk IJ. Elevated C-reactive protein levels during first trimester of pregnancy are indicative of pre- and intrauterine growth restriction. *J. Reprod Immunol.* 2003;59:29-37.
- 115.** Wolf M, Kettyle E, Sandler L, Ecker JL, Roberts J, Thadhani R. Obesity and preeclampsia: The Potential Role of Inflammation. *Obst & Gynecol.*2001;98:757-762.
- 116.** Keski-Nisula, Kirkinen P, Ollikainen M, Saarikoski S. C-reactive protein in uncomplicated parturients delivered by cesarean section. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997;76:862-867.
- 117.** Hvilson GB, Thorsen P, Jeune B, Bakketeig LS. C-reactive protein: a serological marker from preterm delivery?. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002,81:424-429.
- 118.** Thompson FE, Byers T. Dietary assessment resource manual. *J Nutr* 1994 ; 124(sup):245-317.
- 119.** Favier JC, Ireland-Ripert J, Toque C, Feinberg M. Répertoire général des aliments. Table de composition. Paris: TEC & DOC. Lavoisier – INRA; 1997.
- 120.** Mataix J, Tabla de composicion de alimentos española. Granada, Spain: Servicio de publicaciones de la Universidad de Granada, 1995.
- 121.** AE Blak. Critical evaluation of energy intake using the Goldberg cut-off for energy intake: basal metabolic rate. A practical Guide to its calculation, use and limitations. *Internat J of Obesity.* 2000;24:1119-1130.
- 122.** Cucó G, Fernandez-Ballart J, Sala J, Viladrich C, Iranzo R, Vila J, Arija V. Dietary of Clinical Nutrition.2006.0;000:000.
- 123.** Arija V, Salas-Salvadó, Fernandez-Ballart J, Cucó G, Martí Hennenberg C. Consumo, hábitos alimentarios y estado nutricional de la población de Reus. Evolución de la ingestión de energía i nutrientes entre 1983 i 1993. *Med. Clin (Barc)* 1996;106:45-50.
- 124.** Afford SC, Fisher NC, Neil DAH et al. Distinc patterns of chemokine expression are associated with leukocytes recruitment in alcoholic hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J. Pathol* 1998;186:82-89.
- 125.** Devalaraja MN, McClain CJ, Barve S Vaddki K, Hill DB. Increased monocytes MCP-1 production in acute alcoholic hepatitis. *Cytokine* 1999; 11:875-881.
- 126.** Fisher NC, Neil DAH, Williams A, Adams DH. Serum concentrations and peripheral secretion of the beta chemokines monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein1alpha in alcoholic liver disease. *Gut* 1999;45:426-430.
- 127.** Panasiuk A, Prokopowicz D, Panasiuk B, Monocyte chemotactic protein-1 and soluble adhesion molecules as possible prognostic markers of the efficacy of antiviral treatment in chronic hepatitis C. *World J. Gastroenterol* 2004;10:3639-3642.
- 128.** Hui JM, Farrell GC, Kench JG, George J, High sensitivity C-reactive protein values do not reliably predict the severity of histological changes in NAFLD. *Hepatology* 2004; 39: 1458-59.
- 129.** Kalabay L, Nemesanszky E, Csepregi A, et al . Paradoxical alteration of acute – phase protein levels in patients with chronic hepatitis C treated with IFN- alfa2 b. *Int Immunol* 2004;16:51-54.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007



CEIC
Comitè Ètic d'Investigació Clínica

INFORME DEL COMITÈ ÈTIC DE INVESTIGACIÓ CLÍNICA (CEIC)

Informe del Projecte “**Avaluació d'una tècnica ultrasensible per a la determinació de la concentració de proteïna C reactiva i estudi longitudinal en dones embarassades**”, codi: **USPRE-C**, fonts de finançament: Indústria privada, a instàncies de l'investigador principal **Dr. Jordi Camps Andreu**.

D'acord amb les normes de funcionament intern del CEIC i les especificacions de les diferents convocatòries de finançament per a projectes d'investigació amb fons públics, aquest Comitè a la **reunió del 19 de setembre de 2002**, ha decidit pronunciar-se favorablement respecte al projecte anteriorment ressenyat.

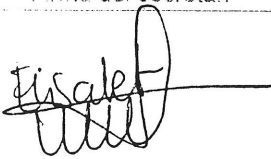

Aquesta aprovació es realitza després d'assegurar-se que es compleixen els requeriments ètics necessaris d'idoneïtat del protocol en relació amb els objectius de l'estudi i que la capacitat de l'investigador i els medis disponibles són els apropiats.

Es recorda a l'investigador principal, la necessitat d'informar al CEIC sobre la marxa del projecte i que al finalitzar aquest hauran de ser inspeccionats els consentiments informats signats pels subjectes inclosos a l'estudi.

Adjuntem relació dels membres assistents a la reunió.

Reus a 19 de setembre de 2002

Ref.: 02-09-19/9proj4

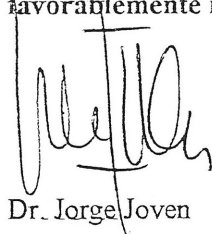
Firma del secretari	Firma del president
	

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

El proyecto titulado **Interacciones genético-nutricionales en el metabolismo de la homocisteína en una muestra representativa de una población mediterránea** y presentado por **Joan D. Fernández Ballart** como investigador principal ha sido evaluado por el comité ético de investigación clínica del Hospital Universitari de Sant Joan/Facultad de medicina de Reus, i ha decidido pronunciarse favorablemente respecto a las modificaciones no relevantes del proyecto reseñado que fue ya favorablemente informado en la reunión del 30 de Junio de 1998 y del proyecto en su conjunto en la versión actual.

Dicho comité, no observa ningún impedimento de carácter ético. Los procedimientos de información y obtención de consentimiento informado se han seguido según la declaración de Helsinki, convenio del Consejo de Europa, la declaración universal de la UNESCO y la legislación española en el ámbito de la bioética

De acuerdo con las líneas marcadas por este comité y las especificaciones de las diferentes convocatorias de líneas de financiación pública de proyectos de investigación, el Comitè Ètic d'Investigació Clínica, en la reunió del 3 de Junio de 1999, ha decidido pronunciarse favorablemente respecto al proyecto anteriormente reseñado.



Dr. Jorge Joven
Presidente



Dra. Isabel Boyer
Secretaria

Comitè Ètic d'Investigació Clínica
Hospital Universitari de Sant Joan/Facultat de Medicina

Reus, 3 de Junio de 1999

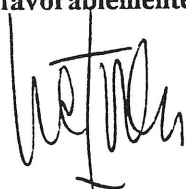
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

El proyecto titulado **Apoptosis y fibrogénesis hepática : Estudios clínicos y experimentales** y presentado por **Jorge Camps Andreu** como investigador principal ha sido evaluado por el comité ético de investigación clínica del Hospital Universitari de Sant Joan/Facultad de medicina de Reus.


Dicho comité, no observa ningún impedimento de carácter ético. Los procedimientos de información y obtención de consentimiento informado se han seguido según la declaración de Helsinki, convenio del Consejo de Europa, la declaración universal de la UNESCO y la legislación española en el ámbito de la bioética.

Por lo que respecta a los animales de experimentación y a instancias de las especificaciones de la presente convocatoria, el comité ético exhorta al investigador principal a garantizar el cumplimiento en todos sus extremos del Real Decreto 223/1988 de 14 de marzo (B.O.E. del 18 de marzo) y la orden de 13 de octubre (B.O.E. del 18 de octubre) sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Lo cual nos consta por la realización previa de otros estudios con animales por parte de dicho investigador.

De acuerdo con las líneas marcadas por este comité y las especificaciones de las diferentes convocatorias de líneas de financiación pública de proyectos de investigación, el Comitè Ètic d'Investigació Clínica, en la reunió del 3 de Junio de 1999, ha decidido pronunciarse **favorablemente** respecto al proyecto anteriormente reseñado.



Dr. Jorge Joven
Presidente



Dra. Isabel Boyer
Secretaria

Comitè Ètic d'Investigació Clínica
Hospital Universitari de Sant Joan/Facultat de Medicina

Reus, 3 de Junio de 1999

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROTEÏNA C-REACTIVA. ESTUDIS EN POBLACIÓ DE L'ÀREA MEDITERRÀNEA.
Núria Bertran Ferrús
ISBN: 978-84-690-7609-5 / DL: T.1340-2007

