

MEMORIA

INVESTIGADOR RESPONSABLE O COORDINADOR DEL PROYECTO: Jaume Marrugat de La Iglesia

TITULO: EVALUACION DE ALGUNOS FACTORES POTENCIALMENTE PROTECTORES DE ENFERMEDAD CORONARIA EN ESPAÑA Y DE SUS BASES MOLECULARES

PALABRAS CLAVE: Lipoproteínas de alta densidad, lipoproteínas de baja densidad, apo AI, paraoxonasa, polimorfismos genéticos, factores de riesgo cardiovascular.

RESUMEN (con clara exposición de los objetivos y potenciales aplicaciones del proyecto)

Objetivo del estudio: Identificación de interacciones gen-ambiente potencialmente “protectoras” de la enfermedad cardíaca coronaria.

Diseño: Estudio de casos y controles con base poblacional

Ambito del estudio: Tres zonas bien delimitadas y cuyas tasas de incidencia de infarto de miocardio estén apropiadamente monitorizadas, de 2 Comunidades Autónomas de España, objetivo 2 (Cataluña y País Vasco) y un área de Mallorca

Sujetos de Estudio: Casos: los pacientes con infarto de miocardio consecutivos atendidos en las zonas de referencia. Controles sin cardiopatía isquémica seleccionados aleatoriamente en la población de referencia..

Determinaciones: Lipoproteínas de alta densidad, LpA-I y LpA-I:A-II, paraoxonasa, polimorfismos genéticos de la paraoxonasa, Glutation reductasa, Superóxido dismutasa y anticuerpos anti-LDL oxidada.

TITLE: EVALUATION OF POTENTIALLY PROTECTIVE FACTORS FROM CORONARY HEART DISEASE IN SPAIN AND THEIR MOLECULAR BASIS.

KEY WORDS:High density lipoproteins, low density lipoproteins, apo AI, paraoxonase, genetic polymorphisms, cardiovascular risk factors.

SUMMARY

Study Objective: To identify potentially protective environmental-gene interactions against coronary heart disease

Design: case-control study

Setting: Three well limited areas with appropriated monitorization of myocardial infarction incidence rates, corresponding to three Communities of Spain (Balears, Cataluña and País Vasco).

Patients: Cases: Myocardial infarction patients recruited in the catchment areas. Controls free of ischemic coronary disease randomly recruited from the reference population.

Measurements: High density lipoproteins, apo AI, paraoxonase, LpA-I and LpA-I:A-II, paraoxonase genetic polymorphisms, glutation reductase, superoxide dismutase, anti-LDL oxidized antibodies.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes y estado actual de los aspectos científico-técnicos o tecnológicos del tema propuesto, incluyendo la bibliografía más relevante.

Destaque el grado de innovación y la oportunidad del tema propuesto, teniendo en cuenta la posibilidad de transferencia de resultados a sectores empresariales o sociales de la Comunidad Autónoma.

Indíquense también posibles coincidencias con actividades de otros grupos o entidades públicas y privadas en España.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), y en particular la cardiopatía isquémica (CI), continúan siendo la principal causa de muerte en España. En 1994, las ECV constituyeron el 31,0% y el 38,6% de las causas de mortalidad en hombres y mujeres respectivamente. La CI produjo, en el mismo año, un total de 20.221 defunciones en hombres (11,5% de la mortalidad global) y 14.700 en mujeres (9,0%). Además, la CI produce en España una gran morbilidad: la incidencia poblacional de infarto agudo de miocardio (IAM) en 1988 por 100.000 habitantes, estandarizada por edad, en el grupo de 25 a 74 años fue de 206,2 en hombres y 36,9 en mujeres, la tasa de letalidad a 28 días (número de casos de IAM mortales / número total de casos de IAM) fue del 36,9% en los hombres y del 55,4% en las mujeres. Se calcula que el número de casos de IAM hospitalizados oscila entre 22.000 y 27.642 por año. La tasa de incidencia poblacional de IM se encuentra a niveles inferiores a la de los países del norte de Europa, Estados Unidos o Australia pero es similar a la de otros países mediterráneos industrializados.

La CI es un proceso multifactorial en el que se involucran factores ambientales y genéticos. Desde hace varias décadas, se conoce que tanto la frecuencia y gravedad de las lesiones ateroscleróticas como las tasas de incidencia y mortalidad varían entre zonas geográficas. Pese a estas observaciones, la compleja interrelación entre los factores ambientales potencialmente implicados en la arteriosclerosis hace que sea muy difícil conocer el verdadero papel de los aspectos genéticos. Algunos de estos factores modifican la concentración de los lípidos y lipoproteínas, los cuales desempeñan un importante papel en la génesis de la CI y de la arteriosclerosis. En este sentido, los polimorfismos genéticos cuyos productos influyen en la distribución de las concentraciones de los lípidos y lipoproteínas pueden ser marcadores útiles para determinar variaciones interindividuales del riesgo cardiovascular.

Cuando se estudian los defectos genéticos hay que distinguir dos tipos de mutaciones. En primer lugar, hay que considerar las mutaciones poco frecuentes pero con un gran impacto en el desarrollo de hiperlipidemia y CI en un individuo en concreto; y en segundo lugar, aquellos polimorfismos relativamente frecuentes que pueden modificar positiva o negativamente la incidencia y la evolución de la enfermedad a escala poblacional. La primera clase de mutaciones proporciona información restringida únicamente al probando(s) y no es útil para el cribaje. Con respecto a la segunda clase de mutaciones, en estos últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios con el objeto de evaluar la asociación de determinados polimorfismos y el incremento del riesgo de CI, cuyos resultados son aún dispares y controvertidos. En este sentido, algunos estudios refieren una asociación significativa entre CI con polimorfismos del DNA, mientras que otros no hallan tal asociación. Las discrepancias observadas pueden ser debidas, al menos en parte, a aproximaciones erróneas o incompletas basadas en un tamaño muestral reducido, a la heterogeneidad étnica de los individuos estudiados, a una selección inadecuada tanto de los casos como de los controles, insuficiente análisis de la influencia concomitante de los factores ambientales, estilo de vida y datos antropométricos. Puesto que la relación de determinados polimorfismos genéticos con CI parece suficientemente contrastada, cabe esperar que si se realizan estudios mejor estandarizados y diseñados, los resultados obtenidos serán más concluyentes.

Por otra parte, puesto que la incidencia de IAM es, como se ha dicho, en nuestro ámbito comparativamente menor y la esperanza de vida más larga que en otras áreas, el estudio de la interacción de los factores ambientales con los genéticos puede contribuir a la identificación de posibles "factores protectores" o característicos de supervivencia prolongada asociada a la ausencia de enfermedad cardiovascular. El conocimiento de estos factores protectores configurados como "perfil protector" puede tener un enorme interés tanto en nuestro medio como en áreas con mayor mortalidad por CI. Entre otras que se llevan a cabo, esta investigación puede contribuir a resolver controversias respecto al beneficio del cribaje genético para predecir el riesgo de CI, abriendo nuevas perspectivas en la prevención primaria y quizá secundaria, de la misma. Dos aspectos emergen como particularmente importantes:

1. El mecanismo mediante el cual se produce una asociación inversa entre las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la CI continúa sin estar completamente esclarecido. Existen evidencias de que las HDL ejercen distintas funciones en virtud de las subpoblaciones específicas que predominen. Las HDL que únicamente tienen apolipoproteína (apo) AI, denominadas LpA-I, poseen un nivel de protección superior al de aquellas con apo AI y apo AII (LpA-I:A-II) siendo este factor, al parecer, independiente de la concentración absoluta de HDL. En este sentido, algunos defectos genéticos que cursan con déficit de HDL no se caracterizan por arteriosclerosis prematura. Por tanto, se ha sugerido que una concentración baja de HDL en pacientes con CI constituiría un epifenómeno en el que la enfermedad estaría más relacionada con otro factor que a su vez tendría una relación inversa con la HDL. Y de ser así, la protección vendría dada por la “calidad” de las partículas de HDL más que por su “cantidad”. Las HDL inhiben la oxidación de las LDL tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque se desconoce el mecanismo exacto. Una posibilidad a tener en cuenta es la implicación de la paraoxonasa, un enzima antioxidante estrechamente ligado a las HDL y especialmente a aquellas partículas que contienen exclusivamente apo AI (LpA-I), y capaz de prevenir el acúmulo de lipoperóxidos en las LDL. En consecuencia, podría especularse que los individuos con concentraciones bajas de HDL pueden presentar un nivel alto de protección si el contenido de paraoxonasa asociado a la HDL-apo AI es apropiado y en ello pueden influir condicionantes genéticos y ambientales. La paraoxonasa es un enzima del grupo de las arylesterasas conocido desde hace tiempo en el campo de la toxicología por su capacidad de degradar los organofosfatos. Se sintetiza en el hígado y circula íntegramente unida a las partículas de HDL, sobre todo en las que contienen apo A-I, (LpA-I). El gen que codifica la paraoxonasa está en el cromosoma 7. Se han descrito dos polimorfismos genéticos de la paraoxonasa, el Glu-Arg191 y el Met-Leu54 cuyas variantes alélicas tienen influencia, al parecer, sobre su concentración y actividad. Con respecto al primero, el alelo B (que condiciona la presencia de una arginina en lugar de glutamina en la posición 191) se halla asociado con concentraciones altas y actividad también alta del enzima, mientras que el alelo A (glutamina en posición 191) se asocia con baja actividad. Con respecto al segundo polimorfismo, el alelo L (presencia de leucina en posición 54) es el que se asocia a alta actividad de la enzima, mientras que el alelo M (metionina en posición 54) está asociada a baja actividad. Por otra parte, la actividad de la paraoxonasa está, al parecer, influida por factores ambientales, como la dieta, y se ha demostrado que su actividad disminuye durante las reacciones de fase aguda. Nuestro interés en este enzima radica en su probada capacidad para evitar la oxidación de las LDL. En un estudio realizado *in vitro*, tras incubar LDL susceptible a la oxidación con HDL o con paraoxonasa purificada, se observó que había una disminución de la oxidación en las dos preparaciones, pero que con la paraoxonasa la disminución era 60 veces más efectiva. Cuantitativamente, 20 µg. de paraoxonasa producían una disminución del 25 % del total de lípidos oxidados. Esta capacidad antioxidante induce a pensar que la paraoxonasa podría ser un factor protector de enfermedad cardiovascular. Sin embargo, los resultados de diversos estudios son hasta el momento contradictorios. En algunos estudios de casos y controles realizados en pacientes con cardiopatía isquémica, la prevalencia del fenotipo de baja actividad es mayor entre los casos, mientras que, otros estudios con el mismo diseño, refieren una prevalencia superior en los controles.
2. La capacidad aterogénica del colesterol y de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) está ligada a la formación de LDL oxidada (LDL-ox), partícula lipoproteica capaz de inducir la formación de “células espumosas” en la placa aterosclerótica e inhibir la relajación de la pared endotelial. El proceso de oxidación de la LDL está vinculado con la formación de radicales libres que causan el “stress” oxidativo celular. La protección frente a estos radicales viene mediada por diferentes mecanismos de origen exógeno provenientes de la dieta (vitaminas E y C, carotenoides, flavonoides, etc) y endógeno (enzimas antioxidantes).

En resumen, la hipótesis en la cual se basa el presente proyecto consiste en que, en nuestra área, a pesar de que la prevalencia de los clásicos factores de riesgo cardiovascular es igual o incluso superior a la de otras zonas (en el contexto nacional o europeo), existiría un grado de protección superior que vendría proporcionado por la presencia de partículas de HDL de alta calidad y de una capacidad incrementada de prevenir la modificación oxidativa de las LDL, incluso sin la existencia de concentraciones elevadas de HDL. Esto podría guardar relación con la concentración de paraoxonasa y con la interacción de ciertos

factores ambientales (dieta antioxidante, ejercicio físico, etc) i factores genéticos (variantes polimórficas de la paraoxonasa). Por otra parte, en nuestro medio puede prevalecer la presencia de partículas de HDL que contienen apo A-I y no apo A-II (LpA-I), las cuales representan la fracción “cardio-protectora”. Los mecanismos responsables de esta “antiaterogenicidad” son desconocidos, al igual que los factores potencialmente capaces de incrementar selectivamente la concentración de LpA-I. No obstante, es de esperar que mecanismos ambientales y genéticos desempeñen un importante papel.

Conocemos las importantes diferencias de prevalencia de arteriosclerosis entre distintas áreas geográficas. También somos conscientes de la imposibilidad de exportar “genes protectores”. Sin embargo, la profundización en el conocimiento de las interacciones entre factores genéticos y ambientales que son especialmente protectoras frente a la CI puede ser crucial en ámbitos menos favorecidos. Estos aspectos pueden analizarse en nuestro país coordinadamente con varias Comunidades Autónomas y la industria farmacéutica.

Además del aspecto científico, el presente proyecto aborda otros dos que tienen que ver con el desarrollo de nuevas tecnologías en el contexto de diagnóstico y tratamiento de la arteriosclerosis.

Si, finalmente, podemos demostrar una relación inversa entre el riesgo de eventos cardiovasculares y una adecuada presencia de enzimas asociados con la HDL que previenen la oxidación de las LDL y teniendo en cuenta que individuos con niveles bajos de HDL no tienen arteriosclerosis clínicamente significativa mientras que otros con una concentración normal de HDL presentan arteriosclerosis prematura, la determinación del estatus antioxidante podría ser útil en el diagnóstico de individuos de alto riesgo cardiovascular. Concretamente, esta determinación sería aplicable en el contexto de la prevención secundaria o en individuos con antecedentes personales o familiares de riesgo cardiovascular.

Por otra parte, en la actualidad, el tratamiento de la arteriosclerosis se orienta a la disminución de la concentración sérica de LDL y al aumento de la de HDL. No obstante, nuevas estrategias sin duda aparecerán a medida que se conozcan los mecanismos básicos con mayor profundidad. En este sentido, existe la necesidad de dilucidar el proceso mediante el cual sea posible elevar las subpoblaciones de HDL que están ligadas a los enzimas que previenen la formación o que destruyen los lípidos biológicamente activos en las LDL oxidadas. Si somos capaces de identificar los genes implicados en la prevención de la intensidad de la respuesta de las LDL oxidadas, seremos capaces de desarrollar nuevas estrategias que modifiquen favorablemente dicha respuesta.

En conclusión, el presente proyecto pretende, entre otros objetivos, demostrar el papel protector de la paraoxonasa y de los agentes antioxidantes por extensión, frente a la CI. En tal caso, es verosímil aventurar que en el futuro se desarrollarán estrategias de inclusión de antioxidantes de síntesis de laboratorio o de terapia génica específicamente encaminadas al incremento de la concentración de partículas de HDL enriquecidas en apo A-I y paraoxonasa como medio de prevención de la arteriosclerosis. En este proceso de desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas cabe considerar la participación del sector empresarial en el contexto de transferencia de resultados, y en este sentido, el presente proyecto cuenta con el interés explícito de la empresa colaboradora.

BIBLIOGRAFIA MAS RELEVANTE

Frecuencia de la Cardiopatía Isquémica en el mundo.-

Burke GL, Sprafka JM, Folsom AR, Luepker RV, Norsted SW, Blackburn H. Trends in CHD mortality, morbidity and risk factor levels from 1960 to 1986: the Minnesota Heart Survey. *Int J Epidemiol* 1989; 18 (Suppl): S73-81.

Dobson AJ, Gibberd EW, Leeder SR et al. Ischemic heart disease in the Hunter region of New South Wales, Australia, 1979-1985. *Am J Epidemiol* 1988; 128: 106-15.

Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la causa de muerte 1987: Resultados básicos. Estadísticas del Movimiento natural de la población. Tomo I. Madrid: Instituto Nacional de Estadística, 1991.

Nuttens MC, Arveiler D, Zafra López S et al. L'infarctus du myocarde dans trois régions françaises: comparaison de l'incidence et de la mortalité en 1985. *Rev Epidem et Santé Publ* 1988; 36: 335-41.

Pérez G, Marrugat J, Sala J and the REGICOR Study Group. Myocardial infarction in Girona: attack rate, mortality rate and 28-day case fatality in 1988. *J Clin Epidemiol* 1993; 46: 1173-1179.

Pérez G, Marrugat J, Sunyer J et al. Mortalidad cardíaca súbita en las comarcas de Girona. *Med Clin (Barc)* 1992; 99: 489-92.

Tunstall-Pedoe H, Kuulasma K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA project. *Circulation* 1994; 90: 583-612.

Wilhelmsen L, Johansson S, Ulvenstam G et al. CHD in Sweden: mortality, incidence and risk factors over 20 years in Gothenburg. *Int J Epidemiol* 1989; 18 (Suppl): S101-8.

Pérez G, Pena A, Sala J, Roset P, Masiá R, Marrugat J and the REGICOR Study Group. Acute myocardial infarction: case fatality, incidence, mortality rate in Girona, Sapin 1990 to 1992. *Int J Epidemiol* 1998. En Prensa.

Estos estudios se refieren a la situación de la mortalidad e incidencia de infarto de miocardio en España y en otros países.

HDL y oxidación lipídica.-

Mackness MI, et al. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993; 104: 129-35.

Estudio básico realizado mediante técnicas in vitro, en el que se demuestra que la paraoxonasa puede reducir la oxidación de las LDL.

Mackness MI, et al. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 69-76.

Revisión global sobre la paraoxonasa, desde su estructura, síntesis y secreción, hasta su función, transporte plasmático, revisando también los aspectos genéticos de esta enzima.

Clendenning JB, et al. Structural organization of the Human PON1 Gene. *Genomics* 1996; 35: 586-9.

Blatter-Garin MC, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. *J Clin Invest* 1997; 99: 62-6.

Descripción de dos polimorfismos genéticos de la paraoxonasa y de su relación con la enfermedad cardiovascular

Oxidación lipídica y arteriosclerosis.-

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-8.

Revisión de los conocimientos actuales sobre el proceso arterioscleroso.

Frisolom GM, Penn MS. Oxidized lipoproteins and atherosclerosis. En: *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Ed Fuster V, Topol EJ. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996.

Navab M, et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 831-42.

Revisiones recientes sobre la importancia de la oxidación de las LDL y los mecanismos antioxidantes endógenos y su papel en la aterosclerosis.

Halliwell B. Reactive Oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91 (Suppl 3C): 14S-21S.

Ballester M. Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico. *Med Clin (Barcelona)* 1996; 107: 509-15.

Revisiones globales sobre los radicales libres, su definición y sus potenciales efectos perjudiciales sobre la salud general.

Jha P, et al. The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiological and clinical trial data. *Ann Intern Med* 1995; 123: 860-72.

Revisión de estudios epidemiológicos y ensayos clínicos que estudian la relación entre el consumo de vitaminas antioxidantes y la aparición de enfermedades cardiovasculares. Aunque en los estudios epidemiológicos se observa una asociación entre las vitaminas antioxidantes (sobre todo la vitamina E) y la menor incidencia de enfermedad cardiovascular, los resultados de los ensayos clínicos son contradictorios.

OBJETIVOS

Descripción realista de los objetivos concretos del proyecto, especificando el producto final o los resultados finales con posibilidad de transferencia a sectores empresariales, en función del tipo de proyecto a desarrollar (proyecto de I+D, proyecto de innovación, proyecto de transferencia de resultados de investigación, proyecto de demostración, proyecto piloto de nuevas tecnologías).

Destaque la posible contribución del proyecto al desarrollo económico y social de la correspondiente Comunidad Autónoma.

Se valorará la adecuación de la propuesta a las áreas prioritarias de la correspondiente convocatoria, así como la relevancia de los objetivos en su contexto tecnológico.

Los objetivos concretos de este estudio son los siguientes:

1. Establecer la prevalencia de los polimorfismos Glu-Arg191 y el Met-Leu54 de la paraoxonasa en casos de IAM ocurridos en Gerona (Cataluña), País Vasco y en un área de Mallorca, y compararla con la de controles representativos de las poblaciones de referencia sin IAM apareados por edad y sexo.
2. Estudiar la relación entre los polimorfismos genéticos de la paraoxonasa, la concentración sérica de la paraoxonasa, el balance lipoperoxidación/estatus antioxidante y las partículas LpA-I con los lípidos y lipoproteínas.
3. Determinar si existen diferencias en la concentración sérica de paraoxonasa, el balance lipoperoxidación/estado antioxidante y la proporción de partículas de HDL con apo AI (LpA-I) entre los casos y los controles.
4. Estudiar el efecto de las interacciones de los polimorfismos genéticos mencionados, la concentración de paraoxonasa, el balance lipoperoxidación/estatus antioxidante y la proporción de partículas de HDL con apo AI (LpA-I) con factores ambientales tales como dieta, actividad física, tabaquismo, consumo de alcohol y rasgos antropométricos.

Objetivos subsidiarios a medio y largo plazo

Las mutaciones genéticas que pueden relacionarse con el riesgo cardiovascular se hallan constantemente en proceso de descripción. Algunas de estas mutaciones pueden ser relevantes en el futuro. Por ello, entre los objetivos del presente proyecto se incluye la creación de un banco genético que posibilite el estudio de mutaciones adicionales. De forma semejante se creará una seroteca con fines parecidos en el ámbito del fenotipo.

La comparación de los resultados de este estudio con el de otros semejantes realizados en países de alta incidencia de IAM puede permitir obtener un avance importante en la comprensión del mecanismo o mecanismos de protección que confieren a España su baja incidencia y mortalidad por IAM a pesar de una relativa alta prevalencia de factores de riesgo cardiovascular cuando se compara con otros países desarrollados.

Los resultados de este estudio pueden permitir el desarrollo de nuevas estrategias en el diagnóstico de la arteriosclerosis en individuos con un perfil lipídico aparentemente normal y también terapéuticas en el campo de la terapia génica o de antioxidantes de síntesis de laboratorio destinadas al incremento de la capacidad antioxidante.

1. BENEFICIOS DEL PROYECTO

Explique la utilidad de la propuesta para los sectores socioeconómicos a los que se dirige. Explique el beneficio según su cobertura (nacional, regional, sectorial).

Para justificar la participación de, al menos, una empresa en el proyecto, adjunte la documentación (acuerdo, convenio, contrato, etc.) que acredite dicha participación, con indicación de las razones del interés de la/s empresa/s y de los recursos (humanos, económicos o materiales) que se comprometen a aportar para colaborar en el desarrollo del proyecto. Especifique la/s persona/s de contacto en la/s empresa/s a efectos del proyecto.

Si existe interés de otras entidades públicas o privadas, adjunte la documentación que justifique dicho interés y la posible aportación de recursos.

A pesar de que en nuestra área, la mediterránea, la tasa de mortalidad por CI es claramente inferior a la de, por ejemplo, países del norte de Europa, no podemos olvidar que la enfermedad cardiovascular constituye la primera causa de mortalidad. Ello conlleva lógicas e importantes implicaciones, tanto a nivel científico como económico y social. Por otra parte, la relación entre los determinantes genéticos y la hipótesis del origen ambiental de la variabilidad geográfica de la CI es todavía poco conocida. Son asimismo pocos los datos de que disponemos en nuestro país. Los estudios efectuados en Gerona reflejan una alta proporción de factores de riesgo cardiovascular clásicos (hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes) y es al menos comparable con otras zonas genográficas donde la prevalencia de CI es muy superior, en una suerte de “paradoja gerundense”. Este proyecto puede ayudar a facilitar la identificación de factores genéticos y/o ambientales protectores en un contexto nuevo que implica la oxidación lipídica y su prevención así como los factores que incrementan selectivamente la proporción de partículas lipoproteicas “cardio-protectoras”. Entre otros, nuestro proyecto puede contribuir a resolver controversias respecto al posible beneficio de los cribajes genéticos, así como definir con más precisión los cambios en el estilo de vida más aconsejables, particularmente en aquellos individuos que por sus antecedentes familiares y/o por sí mismos pueden considerarse de alto riesgo cardiovascular. La definición de un “perfil protector” de CI configurado por hábitos dietéticos y/o interacciones del estilo de vida con factores genéticos puede ser también muy útil en el contexto de otros ámbitos menos favorecidos.

Los resultados de este estudio pueden permitir el desarrollo de nuevas estrategias en el diagnóstico de la arteriosclerosis en individuos con un perfil lipídico aparentemente normal y también terapéuticas en el campo de la terapia génica o de antioxidantes de síntesis de laboratorio destinados al incremento de la capacidad antioxidante en las que tendría cabida la participación de sector empresarial.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN SOLICITANTE

Indique las actividades ya realizadas que avalen la experiencia del grupo de investigación en relación con el proyecto, tanto en lo que se refiere a aspectos científico-técnicos como de transferencia de resultados o tecnología. Se valorará la actividad desarrollada por el grupo de investigación en relación con la financiación previamente recibida.

En el caso de que el grupo solicitante sea de nueva creación para la realización del proyecto, deberá justificarse su composición a partir de la experiencia de sus componentes.

En el caso de proyectos coordinados, cada grupo presentará su actividad por separado.

EXPERIENCIA DEL EQUIPO INVESTIGADOR: MÉRITOS CONSEGUIDOS ENTRE 1991 Y 1997

La Unidad de Lípidos y epidemiología Cardiovascular del IMIM se formó en 1994. En aquel año y coincidiendo con una reestructuración interna del IMIM, un grupo de epidemiólogos, bioquímicos, cardiólogos, intensivistas, internistas, bioestadísticos y cirujanos vasculares que trabajaban paralelamente en el estudio de los distintos aspectos de la arteriosclerosis, así como sus bases bioquímicas, factores de riesgo, consecuencias clínicas y su epidemiología en España, se asocian para abordar colaborativamente el problema de las enfermedades cardiovasculares. Este enfoque multidisciplinario proporciona una aproximación desde varias perspectivas que enriquece el estudio de un proceso multifactorial como es la arteriosclerosis.

En los últimos años, una de nuestras áreas de interés ha sido el estudio de lo que denominamos "factores ocultos de riesgo cardiovascular". En este sentido, nos hemos interesado preferentemente en el estudio de las alteraciones de las lipoproteínas ricas en triglicéridos en pacientes afectos de enfermedad vascular periférica y pacientes con enfermedad vascular cerebral, publicándose los resultados en las revistas *Circulation* 1992, *Stroke* 1992 y *Clin Chim Acta* 1997 respectivamente. Asimismo, los resultados referentes a las anormalidades de los lípidos y lipoproteínas en pacientes afectos de insuficiencia renal crónica se han publicado en las revistas *Kidney Int* 1992 y *Nephrol Dial Transplant* 1993. Otros aspectos analizados conciernen a la influencia de las IDL en la exactitud de la fórmula de Friedewald, publicados en *Clin Chem* 1991 y *Diabetes Care* 1993.

La importancia atribuida a la Lp(a) como factor de riesgo aterogénico nos impulsó a estudiar su distribución en la población catalana, *Interciencia* 1996, y las alteraciones de su concentración en diversas entidades, que se publicaron en las revistas *Angiology* 1991, *Nephrol Dial Transplant* 1992, *Med Clin* 1992, *Stroke* 1992, *Nephrol Dial Transplant* 1993, *Transplant Proc* 1997. Recientemente hemos validado un nuevo método inmuniturbidimétrico para su determinación en suero cuyos resultados se han publicado en *Clin Invest Arteriosclerosis* 1996.

También se han tenido en cuenta los aspectos genéticos, concretamente el papel de los fenotipos de la apo(a) y de la apo E, cuyos resultados se han publicado en revistas tales como *Atherosclerosis* 1993, *Clin Invest Arteriosclerosis* 1993, *Nephrol Dial Transplant* 1993, *Cerebrovasc Dis* 1994, *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1995, *Scan J Clin Lab Invest* 1996, y las alteraciones lipoprotéicas ocultas en individuos normolipidémicos, en *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1994. Hemos descrito las alteraciones lipoprotéicas existentes en pacientes diabéticos tipo I y II, cuyos resultados se han publicado en las revistas *Clin Chim Acta* 1993 y *Diabetes Care* 1994 y la necesidad de precisión en las determinaciones lipoprotéicas en pacientes con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis (*Nephrol Dial Transplant* 1996) y en pacientes con arteriosclerosis extracoronaria (*Angiology* 1996).

En los últimos 6 años hemos desarrollado estudios de actividad física y lípidos en hombres (Estudio MARATHOM). Por medio del cual hemos validado el cuestionario de actividad física de Minnesota en hombres españoles, publicándose los resultados en la revista *Am J Epidemiol* 1994 y establecido la cantidad y la intensidad de la actividad física necesaria para reducir los niveles plasmáticos de colesterol total y colesterol-LDL, y aumentar los de colesterol-HDL, (*Am J Epidemiol* 1996). También hemos

analizado los cambios en las HDL después del ejercicio físico intenso, publicados en *Rev Esp Fisiol* 1991. Un análisis global de la relación entre actividad física y salud cardiovascular ha sido publicado en *Rev Lat Cardiol* 1996.

El importante papel de la LDL oxidada como partícula lipoprotéica, clave en el proceso aterogénico, nos ha conducido a examinar algunos aspectos de la peroxidación lipídica publicados en la revista *Angiología* 1995, así como de la variación biológica de los sistemas antioxidantes endógenos superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX) publicados en *Clin Chem* 1997.

Durante los últimos 10 años hemos desarrollado los procedimientos de registro e identificación de los casos de infarto de miocardio (IM) en Girona. Desde 1987 hasta la fecha se vienen registrando los IM en el ámbito poblacional. Este registro ha permitido determinar la incidencia de IM en Girona, así como su letalidad y los factores pronósticos más relevantes. Parte de estos resultados se han publicado en el *J Clin Epidemiol* 1994, en *Med Clin (Barc)* 1994, *Rev Esp Cardiol* 1994 y en *Int J Epidemiol* 1998 (en prensa). El registro se extenderá al menos hasta el 2006 para poder establecer la tendencia y la variabilidad interanual.

Paralelamente hemos estudiado la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular en las comarcas de Girona en las que se realiza el registro de datos que se publicarán próximamente en *J Epidemiol Comm Health* 1998 (en prensa) y en *Rev Cat Cardiol* 1997.

En colaboración con el Monitoring Infarction Triage Intervention (MITI), proyecto de la Universidad de Washington (Seattle, USA), establecimos comparaciones entre los resultados de su registro de IM y el nuestro. Producto de esta colaboración es una publicación conjunta en *J Thrombosis and Thrombolysis* 1994.

Además, poseemos amplia experiencia en el estudio de supervivencia del infarto de miocardio a largo plazo. Algunos resultados han sido publicados en la *Rev Esp Cardiol* 1993, *Med Clin (Barc)* 1994, *J Clin Epidemiol* 1994, en el *Eur Heart J* 1995, *Am J Cardiol* 1997, *Transp Proc* 1997 y *J Am Coll Cardiol* 1997. También poseemos experiencia en estudios clínicos de cohorte en enfermedades cerebrovasculares cuyos resultados han sido publicados en *Stroke* 1989, *Stroke* 1996 y *J Neurol Sci* 1997.

Asimismo, poseemos experiencia en la coordinación de estudios multicéntricos (*Am J Cardiol* 1993, *Rev Esp Cardiol* 1996) y en el estudio de la Epidemiología Cardiovascular en general (*Medicine* 1993, *Hiperlipoproteinemias y arteriosclerosis* 1992, *Rev Esp Cardiol* 1994, *J Cardiovasc Risk* 1995 y *Med Clin (Barc)* 1997), así como en los aspectos clínicos de la cardiopatía isquémica (*Lancet* 1993a, *Lancet* 1993b, *Med Intensiva* 1993, *Rev Esp Cardiol* 1994a, *Rev Esp Cardiol* 1994b, *Stroke* 1996, *J Am Coll Cardiol* 1997).

En 1995 iniciamos una nueva línea de investigación en Epidemiología genética en nuestro laboratorio de Biología Molecular. Nuestro principal objetivo es estudiar la interacción entre los factores genéticos y los ambientales, haciendo especial énfasis en la búsqueda de factores protectores de la enfermedad cardiovascular. En este sentido, se ha diseñado un estudio de casos y controles que incluye además de uno apareado por edad y sexo, un grupo control de sujetos sanos muy ancianos. Con ello pretendemos identificar factores que predispongan a la longevidad sin enfermedad cardiovascular, sin el inconveniente de los estudios con controles apareados por edad en que dichos controles, aparentemente sanos, pueden acabar desarrollandola en el futuro. Nuestro interés se centra en los polimorfismos genéticos relacionados con la lipoproteína lipasa, y la paraoxonasa, una enzima con capacidad antioxidante ligada a las lipoproteínas de alta densidad. El objetivo a medio plazo incluye la secuenciación de la apoproteína AI en la hiperalfalipoproteinemia, aparentemente frecuente en nuestra área, y el estudio de la asociación entre ciertos factores ambientales como la actividad física y la dieta y los determinantes genéticos.

JUSTIFICACIÓN DE LA NECESIDAD DE COORDINACIÓN

(Sólo en el caso de proyectos coordinados)

Justifique la necesidad de coordinar la actividad de los diferentes grupos para alcanzar los objetivos previstos. El papel a desempeñar por cada grupo ha de estar en consonancia con el plan de trabajo y el presupuesto de la propuesta.

Para poder establecer con certeza el papel de los factores protectores de IAM a nivel poblacional es necesario disponer de la máxima representatividad de la población española incluyendo zonas con prevalencias de los factores de riesgo y tasas de mortalidad e incidencia variados con una variabilidad suficiente. El número de datos individuales de los participantes de que dispondrá en cada zona (ver tamaño de la muestra) garantizará el **poder profundizar comparativamente** entre éstas en aquellos aspectos que se identifiquen como de mayor interés.

El proyecto coordinado entre grupos de investigadores con experiencia en organizar registros de IAM y en obtener muestras aleatorias poblacionales permitirá optimizar los recursos que se puedan asignar a este proyecto y le confiere todas las garantías de éxito.

Desde el punto de vista de la **Comunidad Económica Europea**, se promoverá una investigación colaborativa con otras zonas del continente donde la mortalidad e incidencia de IAM sea incluso mayor.

METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

Concreción de los objetivos especificando metodología, actividades programadas y resultados previsibles. Se valorará el rigor en el planteamiento y la adecuada planificación temporal de las actividades. En proyectos coordinados la planificación ha de ser única para todas las tareas a llevar a cabo.

El plan de trabajo ha de poner de relieve la necesidad de la ayuda que se solicita en cada concepto para alcanzar los objetivos propuestos, con especial atención al capítulo de gastos de personal, cuya necesidad debe justificarse adecuadamente. Además de las tareas a desarrollar por el grupo investigador, deberán especificarse las tareas asignadas, en su caso, al personal contratado y a otro personal que aporten las instituciones solicitantes (becarios, personal de apoyo, etc.).

Indicar, en diagramas similares a los que se indican como ejemplo, el desarrollo temporal de las actividades programadas, la imputación de los posibles gastos de personal a las diferentes actividades y la distribución, por actividades, del presupuesto solicitado.

Síntesis de las tareas a realizar

TAREAS	DESCRIPCIÓN Y COMENTARIO
1ª tarea: Coordinación	Se realizará en el Instituto Municipal de Investigación Médica de Barcelona. Incluirá la coordinación de la recepción centralizada de muestras cuando sea necesario, del cumplimiento de los plazos previstos en el reclutamiento de los casos y de los controles y el almacenamiento, análisis de los datos de todos los centros y control de calidad
2ª tarea: Selección de casos	Cada área selecciona los hospitales de referencia donde se reclutarán los casos durante la fase aguda del IAM. Enteramente financiado por ZENECA Farma.
3ª Tarea: Selección de controles	Se realizará simultáneamente en todos los centros participantes.
4ª Tarea: Análisis de laboratorio	El análisis de los lípidos y lipoproteínas se realizará en cada zona participante de acuerdo con un protocolo común de estandarización analítica. Alternativamente, las muestras serán remitidas al IMIM para su procesamiento. Las determinaciones de paraoxonasa, balance lipoperoxidación/status antioxidante, partículas LpA-I, apo AI y de los polimorfismos genéticos de la paraoxonasa se realizarán en el centro coordinador (IMIM)
5ª tarea: Análisis estadístico y preparación de manuscritos	Cada centro podrá realizar los análisis estadísticos de sus datos aunque se garantiza que en el centro coordinador se realizarán los análisis conjuntos, y se prepararán los manuscritos relacionados con el objetivo

	principal del estudio.
--	------------------------

Sujetos del Estudio

Pacientes (casos): Se seleccionarán prospectivamente aquellos pacientes de ambos sexos hospitalizados por un infarto de miocardio en **2 Comunidades Autónomas del Objetivo 2 (Cataluña, País Vasco)** entre 25 y 75 años de edad. Asimismo se analizará una muestra procedente del área de Mallorca. Para ello cada área seleccionará el o los hospitales de referencia en que se requieran para garantizar la base poblacional del muestreo. (Ver criterios de inclusión/exclusión en las tareas 2 y 3).

Controles: Los controles apareados por sexo y edad se seleccionarán aleatoriamente en las zonas de donde procedan los IAM, tras descartar antecedentes coronarios detectables mediante interrogatorio y electrocardiograma basal. Todos los individuos control incluidos en el estudio estarán además libres de antecedentes de enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad cerebrovascular, diabetes y de otros trastornos endocrino-metabólicos. (Ver criterios de inclusión/exclusión en las tareas 2 y 3).

Tamaño de la muestra

Se ha calculado tomando en consideración las dos **regiones del Objetivo 2 citadas y de una muestra procedente del área de Mallorca, así como la propuesta individual que presenta conjuntamente con esta memoria un grupo de investigación de Castilla La Mancha, región de Objetivo 1 (véase carta de presentación de esta memoria)**. Asumiendo que tanto la proporción estimada de positivos al alelo B del polimorfismo genético Gln-Arg 192 de la paraoxonasa, como en la de portadores de partículas HDL Lp A-I:A-II en los controles sea del 25% deben incluirse 120 casos y 240 controles en cada área (480 casos y 960 controles, asumiendo la participación de las dos regiones Objetivo 2, de un área de Mallorca y de Castilla La Mancha) para disponer de un poder estadístico superior al 90% si se desea: a) detectar como estadísticamente significativa una odds ratio mayor que 1,5 para los dos factores descritos entre casos y controles, y b) detectar diferencias superiores a 15 unidades porcentuales entre los controles de las 4 áreas tanto en la prevalencia de positivos al alelo B del polimorfismo genético Gln-Arg 192 de la paraoxonasa, como en la de portadores de partículas HDL Lp A-I:A-II. Se acepta un riesgo alfa de 0,05 en un contraste bilateral.

Con la muestra de controles propuesta, la prevalencia de ambos factores de cada zona se estimará con un intervalo de confianza de $25\% \pm 5$.

Reclutamiento

Considerando las características de las áreas participantes, las muestras de casos pueden estar reclutadas en dos años y se prevé que las muestras de los controles puedan obtenerse en un solo año. Ambos procesos se realizarían en paralelo.

Tarea 1. Coordinación

El punto de partida inexcusable debe consistir en unas reuniones iniciales de los investigadores con el fin de coordinar el trabajo y de llegar a un consenso acerca de los diferentes aspectos relacionados con la investigación. Estas reuniones iniciales deben también conllevar un

acuerdo global acerca de los puntos de vista de los diferentes equipos multidisciplinares, así como la elaboración de protocolos detallados concernientes a las actividades de coordinación, procedimientos de obtención, transporte y análisis de muestras biológicas y para establecer medidas uniformes sobre aspectos éticos, autorizaciones legales, control de calidad, procesamiento y análisis estadístico de datos, y política de publicaciones. Para el proceso de monitorización del estudio, se propone la celebración de un mínimo de 3 reuniones anuales, en las que se revisarán los objetivos alcanzados y cualquier cambio propuesto en el cumplimiento de las tareas.

Tarea 2. Selección de casos

Criterios de inclusión

Los pacientes con IAM ingresados en los Hospitales participantes serán adecuadamente registrados. Inmediatamente que sea posible tras al ingreso se obtendrán muestras de sangre. En los supervivientes, se obtendrán además muestras de sangre más allá de los 3 meses después del acontecimiento.

Criterios de exclusión

Residencia fuera del área del estudio.

Edad inferior a 25 años o superior a 75.

Pacientes que no manifiesten su consentimiento informado para participar en el estudio.

Tarea 3. Selección de controles

Criterios de inclusión

Los controles se reclutarán aleatoriamente en la zona en que se lleva a cabo el registro de los IAM. La población a entrevistar y explorar ha de ser una tomada de los sujetos de 25 a 74 años apareados con los casos por grupos de edad (5 años) y sexo a partir del último censo electoral disponible .

Criterios de exclusión

- a) Evidencia o historial de cualquier condición médica o quirúrgica que pueda poner en riesgo al sujeto. Esto incluye, aunque no se limita a: alcoholismo, enfermedades autoinmunes, síndrome nefrótico, hipotiroidismo.
- b) Disfunción médica o quirúrgica del sistema gastrointestinal y/o del hígado.
- c) Sujetos con antecedentes de infarto de miocardio o con angor pectoris.
- d) Historia de abuso de drogas o de consumo de alcohol superior a 50 g/día
- e) Cualquier signo de disfunción mental u otro factor que limite la capacidad del sujeto a cooperar en el estudio.

Medidas a realizar tanto en los casos como en los controles

Obtención de las muestras biológicas

En los casos: Se recogerá una muestra de 10 cc de sangre en tubo tipo Vacutainer con EDTA, inmediatamente que sea posible. Se centrifugará el tubo y se obtendrán dos alícuotas de 1 cc que contendrán las células blancas de la interfase entre los eritrocitos y el plasma. En los casos se recogerán también muestras de sangre para la determinación de lípidos, lipoproteínas dentro de las 24 horas desde el inicio de los síntomas siempre que sea posible. En todos los casos supervivientes a la fase aguda del IAM, entre los 3 y los 6 meses después del mismo, se extraerán 2 tubos de sangre con gel separador tipo Vacutainer de 10 cc de sangre, de los cuales se completarán 4 alícuotas de 2 cc de suero tras centrifugación a 2500 rpm durante 10', y una muestra de 5 cc en tubo con heparina de litio. Además se extraerán 5 cc de sangre en un tubo con citrato sódico para

obtener 2 cc de plasma (centrifugados en menos de 60') que se congelará del modo descrito más abajo.

En los controles: Se extraerán 2 tubos de vacío con gel separador tipo Vacutainer de 10 cc de sangre, de los cuales se completarán 4 alícuotas de 2 cc de suero tras centrifugación. Además se extraerán 5 cc de sangre en un tubo con citrato sódico para obtener 5 cc de plasma, 10 cc en un tubo con EDTA para obtener la capa de leucocitos y una muestra de 5 cc en tubo con heparina de litio.

La extracción de sangre de todos los sujetos se realizará tras un periodo de ayunas de al menos 10 horas, excepto en la primera extracción de los casos.

Las alícuotas serán congeladas como máximo a -40°C hasta que sea posible su envío al laboratorio para su procesamiento. Las alícuotas sobrantes se guardarán a -80°C por tiempo indefinido con el fin de disponer de una DNAteca y seroteca para investigaciones futuras.

Identificación de las muestras: Todos los tubos se identificarán mediante un número único de registro. En los casos se añadirá además el número de historia clínica. Existirá un registro tanto de casos como de controles en el que figurarán además de la fecha de extracción, todos los datos de filiación de los pacientes, sexo, fecha de nacimiento y/o edad, dirección y teléfono (ver aspectos éticos más adelante).

Medidas de laboratorio que se pretende realizar en este estudio

Como ya se ha dicho, la intención de los investigadores es conservar muestras tanto de suero como de DNA para futuras determinaciones. Hasta donde sea posible con el presupuesto que finalmente se apruebe para el proyecto, hemos establecido la siguiente relación de prioridades: HDL, HDL que contienen apo AI (LpA-I), paraoxonasa, polimorfismos de la paraoxonasa, apo AI, autoanticuerpos anti LDL oxidada, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, colesterol, triglicéridos y Lp(a). En los casos en que sea posible se efectuarán determinaciones en la fase aguda, y en todos los supervivientes que acepten, a los tres meses del IAM.

Medida de la actividad física

Se utilizará el cuestionario de actividad en el tiempo libre de Minnesota que ha sido validado para su uso en hombres españoles (Elosua R et al. Am J Epidemiol 1994;139:1197-1209). Se obtendrá el promedio diario de actividad física en el tiempo libre del último año. El tiempo de aplicación del cuestionario es de unos 20 minutos como máximo. En los casos se aplicará en la fase aguda y a los 3 meses del IAM.

Calidad de vida

Se evaluarán datos relativos a la calidad de vida mediante el cuestionario del Medical Outcomes Study (Short Form SF-36) validado para su uso en España. Es un cuestionario autoadministrado que requiere unos 10 minutos. En los casos se aplicará en la fase aguda y a los 3 meses del IAM.

Electrocardiograma basal

En los grupos de control se obtendrá un electrocardiograma basal que se evaluará mediante el código de Minnesota aplicado por lectores entrenados. Se utilizarán las 12 derivaciones estándar.

Consumo de tabaco

Se utilizará un cuestionario de 14 preguntas estándar adaptado del Estudio MONICA de la OMS. En los casos se aplicará en la fase aguda y a los 3 meses del IAM.

Diabetes y glicemia

Se preguntarán los antecedentes de diabetes según diagnóstico previo y tratamiento tanto dietético como farmacológico. Se medirá la glicemia en ayunas.

Dieta y consumo de alcohol

Se utilizará un cuestionario dietético previamente validado. Las principales variables de interés serán: la proporción de energía procedente de grasas, hidratos de carbono y proteínas. Se evaluará la proporción de ácidos grasos saturados y mono y poliinsaturados (trans, n3, n6), antioxidantes (ácido retinoico, alfa y gamma tocoferol y vitamina C), alimentos vegetales y procedencia de las proteínas. Incluirá un cuestionario cuidadoso del consumo de alcohol en los últimos 7 días. En los casos se aplicará en la fase aguda y a los 3 meses del IAM.

Medida de la Tensión arterial y los antecedentes de hipertensión

Dada la importancia de obtener unos datos fidedignos y la facilidad con la que esta variable se modifica es imprescindible seguir una estricta rutina para su medición y además realizar una adecuada calibración de los instrumentos para su registro. Se utilizará un aparato automático tipo HOME ROM 705 validado.

El sujeto debe evitar al menos una hora antes la realización de cualquier tipo de ejercicio físico, debe abstenerse también de efectuar una comida o bebida importante, de fumar y de tomar medicación que pueda afectar directamente a la TA (excepto en hipertensos tratados). Debe evitarse también que cualquier tipo de ropa pueda comprimir y alterar la medición. Los sujetos estarán sentados y en una posición confortable. Se medirá también en posición confortable y con el brazo relajado, la circunferencia del mismo.

También se recogerán los antecedentes de diagnóstico y tratamiento de la hipertensión.

En los casos se aplicará en la fase aguda y a los 3 meses del IAM.

Medidas antropométricas

Peso: Se medirá junto con la talla. Se utilizará una balanza de precisión, de fácil calibración y ésta se realizará cada día y/o cada vez que se desplace el aparato; asimismo deberá comprobarse después de cada medición el retorno al nivel cero. La báscula debe estar situada sobre una superficie plana y el sujeto en el centro de la plataforma. Las lecturas se redondearán a 200 gramos. Los individuos deberán llevar ropa ligera (sin zapatos, chaquetas, abrigos, etc.). Deberá renunciarse a la medida en los sujetos que sean incapaces de mantenerse inmóviles en la balanza (p.e. amputados)

Talla: Deberá realizarse la medición en posición vertical perpendicularmente a la superficie del suelo. Se redondearán las medidas a 0.5 cm. Los sujetos deberán retirar sus zapatos, chaquetas, abrigos etc. Deberán rechazarse todos aquellos sujetos que sean incapaces de mantenerse en posición vertical.

Perímetro de la cintura: Se localizará el punto medio entre la última costilla y la cresta ilíaca. La medida se realizará en centímetros y se redondeará a 0.5 cm. Se usará una cinta métrica y se realizará la medición en posición horizontal y con ropa ligera.

Perímetro de la cadera: Se registrará la máxima longitud circunferencial de las nalgas en centímetros, redondeando la medida a 0.5 cm. Sirven las mismas consideraciones que para la medición de la cintura.

Pliegues cutáneos: Se medirá el pliegue tricípital y el perímetro braquial. Se realizará la medición en ambos brazos. Se realizarán tres mediciones consecutivas en cada uno de los brazos, dejando que los tejidos recuperen su elasticidad. Se anotarán las seis lecturas. El pliegue se tomará con el dedo índice y pulgar de la mano izquierda, y el compás con la mano derecha, siempre perpendicular al pliegue. El compás debe estar a 1 cm de distancia de los dedos que toman el pliegue. El lugar de medición es el punto medio de la línea que une acromion y olecranon. La

lectura se hará en los tres primeros segundos de tomar el pliegue. El paciente debe estar en posición erecta con el brazo relajado y paralelo al cuerpo.

En los casos se medirá en la fase aguda y a los 3 meses del IAM.

Nivel de escolarización y nivel socio-económico

Se anotarán los años de escolarización de cada participante hasta el máximo grado académico alcanzado.

Tarea 4. Análisis de laboratorio

Análisis de los lípidos y lipoproteínas

Se determinará la concentración del colesterol y triglicéridos totales mediante métodos enzimáticos y el colesterol HDL tras precipitación de las lipoproteínas que contienen apo B. El colesterol LDL se determinará mediante la fórmula de Friedewald. La concentración sérica de la apo AI se determinará mediante inmunturbidimetría. La concentración de partículas de HDL que contienen apo AI (LpA-I) se determinará mediante electroinmunodifusión y la de partículas de HDL con apo AI y apo AII (LpA-I:A-II) se calculará a partir de la diferencia entre la apo AI sérica total y la concentración de LpA-I. También se determinará la lipoproteína(a) (Lp(a)), mediante inmunturbidimetría.

Análisis del DNA

La extracción del DNA se realizará mediante procedimientos estandarizados.

Con el análisis del DNA se determinarán los polimorfismos Glu-Arg191 y Met-Leu54 de la paraoxonasa mediante PCR y digestión del DNA con las enzimas de restricción apropiadas.

Estado antioxidante

<u>Medida</u>	<u>Método</u>
Superoxido dismutasa (SOD) (e)	Reducción de azul de nitrotetrazolium
Gluthation Peroxidasa (GPX) (e)	Reducción del sistema gluthation
Paraoxonasa	Enzimoinmunoanálisis (ELISA)

Nivel de oxidación de la LDL en plasma

<u>Medidas</u>	<u>Método</u>
Ac anti LDL oxidada	ELISA

Otras determinaciones

Además, a todos los individuos incluidos en el estudio se les efectuará determinaciones de glicemia basal, y fibrinógeno por coagulometría.

Estandarización de las técnicas y control de calidad

La determinación de los polimorfismos genéticos se halla actualmente estandarizada en el IMIM. Con respecto a los lípidos, nuestra Unidad sigue varios programas de control de calidad externos (entre ellos, el del Colegio de Patólogos de Norteamérica y el de la OMS). Para el análisis del DNA, no existen hasta el momento Laboratorios de Referencia. Por lo tanto, el procedimiento utilizado en nuestro laboratorio consiste en efectuar periódicamente replicados ciegos, realizados por diferentes técnicos, con el objeto de analizar la variabilidad inter-observador. Asimismo, está previsto el envío periódico de muestras a otro laboratorio externo para analizar el grado de concordancia

Tarea 6. Análisis estadístico.

El análisis de los datos incluirá la estimación de las odds ratio y la fracción atribuible, en modelos de regresión logística no condicional, ajustados por los potenciales factores de confusión, en los que se probará el efecto de las interacciones entre factores ambientales y genéticos.

También se utilizarán técnicas bivariantes para analizar la asociación entre casos y controles como la t de Student o su equivalente no paramétrica cuando sea necesario, el análisis de la varianza y de Ji al Cuadrado.

Etapas del desarrollo del estudio

Teniendo en cuenta el tamaño de la muestra y el número de determinaciones a realizar, creemos que la duración total del estudio no será inferior a tres años. Las etapas principales del estudio comprenderán una primera fase de estandarización de las técnicas analíticas y moleculares y estudio piloto con un 10% de la muestra prevista que ocupará los primeros 12 meses. El procesamiento de las primeras muestras, así como una primera evaluación de control de calidad se iniciará en el primer semestre del segundo año, continuándose hasta el primer semestre del tercer año que es cuando se realizará una evaluación de los resultados. Durante el segundo semestre del tercer año se terminarán las determinaciones y se elaborarán las publicaciones. Durante este periodo se discutirá entre los investigadores del proyecto la posibilidad de investigaciones futuras.

Implicaciones éticas

En lo que concierne a las consideraciones éticas, mediante el proyecto presentado aquí se obtendrá información clínica y genética de una muestra amplia de individuos. Consecuentemente, el uso de esta información debe someterse a las normas éticas de la Investigación Biomédica en humanos. En este sentido, el presente proyecto ha obtenido la aprobación del Comité Etico de Investigación Clínica Local (ver certificado adjunto). Los análisis del DNA pueden proporcionar información que es inmutable y por tanto conllevan implicaciones de privacidad. La privacidad y confidencialidad de la información genética se garantizarán limitando el acceso a los datos de filiación de los participantes a un grupo de investigadores autorizados. Se informará a los participantes sobre las características y exploraciones que se realizarán y se les solicitará el consentimiento informado previo a la inclusión en el estudio. Se respetarán los principios de experimentación en humanos del acuerdo de Helsinki. Además, pretendemos que: 1) se garantice a todos los individuos incluidos en este estudio que lo deseen el acceso a la información obtenida del análisis genético; 2) los aspectos relativos a la confidencialidad deben seguir las regulaciones que priven a nivel local o, en su defecto, el espíritu ético del Programa Genoma Europeo, y 3) todos los participantes reciban un documento informativo y firmen su consentimiento en participar en el estudio. Se informará, tal como prevee el artículo 5 de la Ley Orgánica 5/1992, de Regulación del Tratamiento Automatizado de los Datos de Carácter Personal, de que éstos podrán ser objeto de tratamiento automatizado y de los derechos que asisten a los participantes en estudio de consultar, modificar o eliminar del fichero sus datos personales identificativos. La responsabilidad del fichero global y en el caso de Cataluña corresponde al Instituto Municipal de Investigación Médica (IMIM) de Barcelona.

Limitaciones del estudio

Puede argumentarse que va a existir un sesgo de selección de los pacientes con IAM menos graves (los supervivientes). Esto es en parte cierto ya que se tomará una muestra de sangre para realizar

determinaciones lipídicas todos los pacientes en que sea posible. Esto se realizará con extracciones obtenidas lo antes posible dentro de las 6 horas siguientes al inicio de los síntomas del IAM. La tasa de mortalidad hospitalaria es, en España, alrededor del 10% en los pacientes de menos de 75 años. Con lo cual ésta será aproximadamente la tasa de pérdidas para el examen de los 3 a 6 meses. Debido a que los datos de lípidos obtenidos en la fase aguda del IAM no son completamente fiables, se realizará la mencionada extracción de sangre en la fase aguda y a los 3 meses en los pacientes; y, por otro, se garantizará la disponibilidad de ADN cercana al 100% de los casos al tomar la muestra destinada a este fin en todos ellos.

El argumento precedente puede ampliarse y aplicarse a los cambios que aparecen en la concentración de lípidos y en el estado antioxidante de los pacientes que han sufrido un IAM tras 3 o más meses de probables cambios en los hábitos dietéticos, de actividad física y tratamientos farmacológicos. Aquí debe añadirse el hecho de que se medirán tanto los hábitos dietéticos y de calidad de vida como de actividad física previos al IAM y tras los 3 a 6 meses del mismo para controlar el efecto de dichas modificaciones.

Es conocido que suele existir un sesgo de recuerdo entre casos y controles cuando se estudia patología grave como un IAM. Esto afecta básicamente a las encuestas. Esta limitación es compartida por todos los estudios de este tipo.

INSTALACIONES, INSTRUMENTACION Y TECNICAS DISPONIBLES PARA LA REALIZACION DEL PROYECTO

Infraestructura básica de laboratorio
Centrífugas y ultracentrífugas
Autoanalizador selectivo de parámetros bioquímicos
Sistema de electroforesis vertical
Coagulómetro
Lector de placas de ELISA
Termociclador
Secuenciador
Transiluminador

El Instituto Municipal de Investigación Médica (IMIM) de Barcelona dispone del soporte informático necesario para el almacenamiento y tratamiento estadístico de los datos del estudio.

La empresa ZENECA Farma se compromete a financiar la selección de pacientes para el estudio en los próximos 3 años, en el marco de la cofinanciación del estudio IBERICA de prórroga automática en 8 comunidades autónomas (véase documento acreditativo). Su inversión total, que comprende la cofinanciación del estudio IBERICA realizado en 8 comunidades autónomas y la cofinanciación de las 3 comunidades autónomas (2 regiones del objetivo 2 y 1 del objetivo1) que presentan coordinadamente la presente memoria es de 61.600.000 pts, en total : 57.600.000 pts en metálico para cofinanciar al personal necesario, 2.700.000 pts en viajes, dietas y organización de reuniones, 200.000 pts en soporte administrativo, 600.000 pts en material de imprenta y comunicaciones y 500.000 pts en soporte logístico de recogida y distribución de documentación y material entre los investigadores del estudio. Las cantidades específicas aportadas por la empresa se especifican en cada subproyecto.

ANEXO. MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOJA DE INFORMACION PARA EL POSIBLE PARTICIPANTE

Título del estudio: Evaluación de algunos factores potencialmente protectores de enfermedad coronaria en España y de sus bases moleculares

**Unitat de Lípids i Epidemiologia Cardiovascular
Institut Municipal d'Investigació Mèdica
c/ Doctor Aiguader, 80
Barcelona**

Investigador principal: Dr. J. Marrugat

Investigadores del estudio: Dr. M. Sentí, Dr R. Elosúa, Dr. J. Marrugat, Dr. R. Masià, Dr. J. Sala.

Objetivo

Dado que en diversos estudios la prevalencia de enfermedad cardiovascular es inferior en nuestro medio que en otros países, este estudio tiene como objetivo investigar la presencia de factores protectores de la misma.

Metodología empleada. Desarrollo del estudio

Antes de iniciar el estudio se le someterá a un control analítico de sangre. Los resultados del análisis realizado le serán enviados a su domicilio. Si Vd. no quiere que le entreguemos estos resultados indíquelo a cualquiera de los investigadores del estudio.

Se le realizará una extracción de sangre y se le efectuarán encuestas alimentarias, de actividad física y consumo de alcohol y tabaco.

Actualmente la investigación sobre las enfermedades cardiovasculares avanza deprisa y puede ser de gran importancia las nuevas pruebas que aparezcan, entre ellas el estudio genético (DNA). Si Vd da su consentimiento una parte de las muestras de suero y DNA permanecerán congeladas en previsión de cualquier análisis futuro del cual sería previamente informado. También nos gustaría poder contactar con Vd. de aquí a un tiempo para poder repetir una parte de los análisis y las encuestas.

Beneficios y riesgos

El beneficio que Vd. obtendrá por su participación en el estudio será un mejor conocimiento de su estado de salud, especialmente del colesterol y de otras grasas de la sangre.

El estudio no implica ningún riesgo para su salud ya que la cantidad de sangre obtenida en cada extracción no sobrepasa la de un análisis de rutina y los análisis a realizar son los habituales en las revisiones médicas.

Voluntariedad

Su participación en este estudio es voluntaria por lo que en cualquier momento puede retirarse del mismo.

Confidencialidad

Todos los datos recogidos sobre su participación en este estudio serán considerados como confidenciales. En las listas de trabajo sólo constará el número que se le haya asignado en el estudio. En el informe final del estudio o en caso de comunicar estos resultados a la comunidad científica, se mantendrá su personalidad en el anonimato.

Investigadores del estudio

Si tiene alguna duda sobre algún aspecto del estudio o le gustaría comentar algún aspecto de esta información, por favor no deje de hacérselo saber a los miembros del equipo investigador (Drs.

Marrugat, Sentí y Elosúa, en la Unidad de Lípidos y Epidemiología Cardiovascular del IMIM (Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona, teléfono 2211009) o Drs. Masià y Sala (Unitat Coronària del Hospital Josep Trueta de Girona, teléfono 972-202700).

Consentimiento

En caso de que una vez leída esta información y aclaradas las dudas que pudieran haberle surgido decida participar en el estudio, deberá firmar este “modelo de información”.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Institut Municipal d’Assistència Sanitaria (IMAS) de Barcelona (nº).

He leído esta información, he podido consultar mis dudas, comprendo los objetivos del estudio y lo que comporta participar en éste.

.....
.....
Nombre y apellidos del participante Firma Fecha

Acepto que los investigadores del estudio conserven el material biológico (suero y genético) para futuras investigaciones y acepto que se pongan en contacto conmigo en el futuro para conocer mi estado de salud.

.....
.....
Nombre y apellidos del participante Firma Fecha

.....
.....
Nombre y apellidos del investigador Firma Fecha