

ESTUDIO DRECE III
(DIETA Y RIESGO DE ENFERMEDAD
CARDIOVASCULAR EN ESPAÑA)
DOCE AÑOS DE SEGUIMIENTO DE UNA COHORTE
ESPAÑOLA

PROTOCOLO

Versión 1.0 Borrador

2. TABLA DE CONTENIDOS

1.	PÁGINA DE TÍTULO.....	1
2.	TABLA DE CONTENIDOS.....	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
4.	ANTECEDENTES.....	3
5.	HIPÓTESIS	7
6.	OBJETIVOS.....	8
7.	METODOLOGÍA.....	9
7.1.	POBLACIÓN Y MÉTODOS.....	9
7.2.	RECLUTAMIENTO Y PROCEDIMIENTOS.....	11
7.3.	ENCUESTA DE HÁBITOS ALIMENTARIOS	11
7.4.	PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	12
8.	PLAN DE ANALISIS ESTADÍSTICO.....	15
8.1.	PODER ESTADÍSTICO.....	15
8.2.	PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
9.	REFERENCIAS.....	18

3. INTRODUCCIÓN

El estudio DRECE fue diseñado para conocer la situación real de la población española ante el riesgo de padecer ECV, en función de la prevalencia de factores de riesgo predisponentes, y su relación con los hábitos dietéticos. El estudio concluyó en 1992 con la creación de una base de datos conteniendo los diversos factores de riesgo mayores, perfil de laboratorio (perfil lipídico y otras determinaciones biológicas básicas), y resultados individualizados de la encuesta dietética. Los principales resultados de este estudio indicaban que la prevalencia de factores de riesgo mayores no era significativamente diferente a la encontrada en otras sociedades occidentales. A pesar de ello, los datos de mortalidad en España parecían indicar la existencia de algún efecto protector que explicase la relativa paradoja entre ambas realidades: mortalidad relativamente baja y prevalencia de factores de riesgo relativamente elevada. Cinco años después se abordó el estudio DRECE II sobre un subgrupo de la cohorte inicial que permitió demostrar, a pesar del escaso tiempo transcurrido, diferencias de morbilidad entre los que presentaban en 1992 un patrón de riesgo para ECV, y aquellos que no lo presentaban (probabilidad de desarrollar algún tipo de accidente coronario 3,9 veces superior). El estudio puso de manifiesto también cambios desfavorables del perfil lipídico y de los patrones alimentarios. Transcurridos 10 años desde el inicio y teniendo presentes las tasas estandarizadas de mortalidad en España, creemos tener suficiente potencia estadística como para poder establecer relaciones entre el perfil de riesgo y hábitos alimentarios de la cohorte DRECE y la morbilidad y mortalidad cardiovascular, así como la evolución y tendencia del patrón alimentario, perfil de factores de riesgo, y perfil lipídico en la población española.

4. ANTECEDENTES

La arteriosclerosis y la enfermedad cardiovascular (ECV) constituyen la primera causa de muerte en los países desarrollados(1) pero, comparando las tasas de mortalidad por ECV en España con las de otros países, se observa que nuestras tasas son relativamente bajas(2,3). La mortalidad por ECV en España, según los datos disponibles en 1996(4) , ha sufrido una clara disminución en estos últimos años aunque, si se analizan los datos de mortalidad por ECV divididos en mortalidad por causa cerebrovascular y por causa cardioisquémica, se comprueba que este descenso está motivado fundamentalmente por el experimentado en la mortalidad por enfermedades cerebrovasculares.

La situación relativamente estable en la que se encuentran las tasas de mortalidad por enfermedad cardioisquémica, a pesar de los esfuerzos que se realizan por disminuirlas, nos conduce a pensar que los factores de riesgo de ECV están afectando de forma importante a la población general(5-7). La asociación de las alteraciones del metabolismo lipídico y las ECV está ampliamente demostrada por diversos estudios epidemiológicos, de manera que, en la actualidad, constituyen uno de los principales factores de riesgo de ECV(8,9). Así, se demuestra que existe una estrecha correlación entre las concentraciones de colesterol plasmático y la ECV, que se acentúa cuando las concentraciones de colesterol superan los 200 mg/dl, con una pendiente que aumenta de forma exponencial y paralela a la curva de mortalidad global.

Hasta el momento en el que se planteó el estudio DRECE existían pocos estudios epidemiológicos realizados sobre la población española cuyo propósito fuese la valoración de los hábitos dietéticos, el perfil lipídico y el análisis de prevalencia de otros factores de riesgo de ECV. Los resultados de los trabajos realizados durante esos años, en los que se analizó el perfil lipídico de la población infantil española(10,11), indicaban que entre un 15 y un 29% de los niños españoles presentaban concentraciones de colesterol total superiores a los 200 mg/dl. Esto hacía pensar que, a medio plazo, se produciría en España un importante aumento de las tasas de mortalidad por ECV. Otros estudios realizados, con posterioridad, en grupos selectivos de población adulta, pusieron de manifiesto la existencia de un perfil lipídico similar al de otros países mediterráneos(5,12-13).

La importancia que tiene el conocimiento de la concentración de los diferentes lípidos y lipoproteínas en la población española radica en el hecho de que, si bien la hipercolesterolemia y las alteraciones del metabolismo lipídico son uno de los principales factores de riesgo de ECV(15), también es cierto que es uno de los factores modificables, junto con la concentración de otros lípidos plasmáticos (14,15), que nos permite una intervención, junto a la presión arterial y al consumo de tabaco. El beneficio que comportaría la normalización de las alteraciones del metabolismo lipídico y la reducción en la prevalencia de hipercolesterolemia podría contribuir a modificar la estabilidad de las tasas de mortalidad cardioisquémica, disminuyéndola de forma sustancial(16).

La dificultad de comparar los resultados del perfil lipoproteico obtenidos en poblaciones de distintas regiones españolas o grupos concretos, realizados con metodologías diversas, hace imposible la extrapolación de los mismos a la población global. Debido a la falta de estudios amplios que contemplen a la totalidad de la población española, el estudio DRECE fue diseñado para poder conocer la situación de riesgo de presentar ECV en España estimando la prevalencia de los factores que predisponen a esta enfermedad y su relación con la dieta.

El estudio DRECE concluyó en 1992 con la creación de una base de datos relacionados con los diversos factores de riesgo mayores, perfil de laboratorio (perfil lipídico y otras magnitudes biológicas básicas) y resultados individualizados de la encuesta dietética. Los principales resultados de este estudio(17,18) indicaban que la prevalencia de estos factores de riesgo mayores no era significativamente diferente a la encontrada en otras sociedades occidentales. No obstante, los datos de mortalidad en España parecían indicar la existencia de algún efecto protector que explicase la relativa paradoja entre ambos cuadros (mortalidad relativamente baja y prevalencia de factores de riesgo relativamente elevada).

Este hecho nos animó a realizar un segundo corte de esta cohorte (los participantes en el estudio DRECE) a los 5 años de seguimiento, si bien de forma restringida: para ello seleccionamos a los individuos considerados por las recomendaciones científicas(6) como portadores de alguna elevación del riesgo coronario y a una población control emparejada por sexo y edad, entre la población considerada como de bajo riesgo.

La población total seleccionada fue de 1400 individuos, de los que aproximadamente 1000 pudieron ser reexaminados. Dado que el periodo de seguimiento había sido relativamente corto (4.7 años de media), la edad de la cohorte relativamente baja (entre 10 y 65 años en 1997), y el tamaño de la muestra relativamente pequeño, y tal y como esperábamos, no encontramos diferencias en la mortalidad total, pero sí las hallamos en la morbilidad entre ambos grupos (el grupo de riesgo presentó un riesgo de desarrollar algún tipo de accidente coronario 3,9 veces superior al de la población

de bajo riesgo) Por otra parte, en este segundo análisis de parte de la cohorte del estudio DRECE (DRECEII), pudimos observar cambios relativamente desfavorables del perfil lipídico⁽¹⁹⁾ (incluso después de corregir por el incremento de edad) y de los patrones alimentarios⁽²⁰⁾.

Como ya hemos comentado, existen múltiples hipótesis que sitúan a la población española como una población de bajo riesgo coronario y en la que no serían válidas las estimaciones del riesgo coronario obtenidas mediante la aplicación de ecuaciones (como las tablas de Framingham) obtenidas en otras poblaciones de mayor riesgo. Por otra parte, se especula con la existencia de "algún" efecto protector en la población española que podría ser el responsable de este relativamente bajo riesgo. No obstante, lo que si estamos observando es que la tendencia en mortalidad coronaria está siguiendo un signo distinto al de otros países occidentales (no se modifica o aumenta ligeramente, mientras la mortalidad total estandarizada disminuye significativamente), de manera que aunque lentamente está aumentando su impacto proporcional (ya es la primera causa de muerte).

Dentro de los posibles factores protectores, se ha hecho un especial seguimiento de determinados factores ambientales relacionados con la dieta, y en especial con la composición en ácidos grasos de la misma, sin que los resultados hayan sido concluyentes. Incluso los estudios de intervención con determinadas dietas, ricas en aceites de pescado (estudio DART) o alfa-linolénico (Estudio Lyon), realizados en prevención secundaria y con resultados espectaculares (reducciones muy significativas del riesgo relativo de muerte coronaria), no han sido capaces de relacionar el descenso de mortalidad con la abundancia de un determinado ácido graso, dirigiendo en parte la atención hacia la posibilidad de la existencia en esas dietas de algún otro componente con una gran potencia protectora.

De hecho, la población española se encuadra dentro del conjunto de la población mediterránea en la que el riesgo coronario absoluto es inferior al de otras poblaciones cercanas. No obstante, es poco probable que sean factores genéticos los que expliquen una gran parte de la variabilidad en mortalidad coronaria, sobre todo teniendo en cuenta la diversidad de etnias que concurren en el área considerada como mediterránea, y con frecuencia se atribuye a la "dieta mediterránea" este efecto protector. No obstante, como ya hemos comentado antes, es difícil atribuir a macronutrientes concretos este efecto, y posiblemente haya que recurrir a otros componentes de la dieta o de la exposición ambiental para explicar los beneficios del "área mediterránea".

Dentro de este contexto se encuentran los sistemas relacionados con el estado oxidante/antioxidante: durante los diversos procesos metabólicos se generan una serie de especies moleculares potencialmente nocivas (especies reactivas del oxígeno, nitrógeno y derivados clorados), Las concentraciones de estas especies reactivas son controladas por un sistema de defensa antioxidante. Varios componentes de este sistema son micronutrientes en sí mismos (vitaminas, A,C y E) o son dependientes de micronutrientes de la dieta (como las CuZn y Mn Superóxido Dismutasas o Selenio). Las defensas antioxidantes actúan como un sistema coordinado en el que las deficiencias (incluso deficiencias marginales de algunos elementos como el cobre) de uno de sus componentes pueden afectar la eficiencia del resto.

Por otra parte, otros elementos como el Hierro pueden actuar como prooxidantes cuando se acumulan (ya sea por defectos incluso poco significativos de su metabolismo o por alteraciones del aporte del mismo), alterando igualmente el mencionado

equilibrio, y otros elementos como el mercurio (que se encuentra en concentraciones elevadas en determinadas especies de pescado) puede actuar como prooxidante y anular los efectos beneficiosos de otros elementos como el propio Selenio o las propiedades antiaterogénicas de los ácidos grasos n3 del pescado que lo contiene. De esta manera, podemos observar que los componentes de la dieta o la exposición de los mismos a determinados contaminantes, pueden modificar o esconder los efectos que en ocasiones se atribuyen a los macronutrientes de la misma. Por este motivo, y teniendo en cuenta que existen suficientes evidencias del papel que determinados elementos poseen como agentes proaterogénicos o antiaterogénicos, es por lo que nos hemos propuesto conocer la situación actual de la población española en cuanto a exposición a los mismos, pero no solo por lo que respecta a la composición teórica de los alimentos sino a su integración en el organismo a través de medidas objetivas de los mismos, teniendo en cuenta que las mediciones aisladas de uno solo de los componentes de este sistema oxidativo/antioxidativo probablemente no sea suficiente como para poder realizar una estimación más o menos precisa de este conjunto.

Un componente particular del sistema anterior es la concentración de homocisteína, que también puede actuar como prooxidante. Con respecto a esta molécula y a su papel como factor de riesgo cardiovascular, los resultados han sido por el momento fuertemente controvertidos. Es posible que parte de la controversia sea debida a los determinantes de la concentración plasmática de homocisteína, entre los que se encuentran la vitamina B12 y ácido fólico como cofactores metabólicos, las variantes genéticas de los enzimas que intervienen en su metabolismo y diversas condiciones patológicas que pueden interferir con la eliminación de la misma. Es posible que una elevación de la concentración de homocisteína que sea secundaria a un déficit, incluso marginal, de vitamina B12 o ácido fólico no tenga el mismo impacto que una elevación de la concentración de homocisteína que sea secundaria a modificaciones genéticas de los enzimas responsables de su metabolismo. Por esta razón, parece necesario incluir este conjunto de magnitudes (Homocisteína, ac. Fólico y vitamina B12) dentro del conjunto del sistema de defensa antioxidante del organismo.

Por fin, otro de los componentes de la exposición ambiental característica del mediterráneo es el grado de insolación (y su interacción con lo anterior). De hecho, existen múltiples informes que postulan la existencia de una variación estacional de la mortalidad cardiovascular e incluso una participación del grado de insolación en la variabilidad de la mortalidad coronaria norte-sur. Uno de los factores implicados en la génesis de esta variabilidad podría ser el de la concentración de 25 OH Vitamina D3, que aparte de tener connotaciones como nutriente, también las tiene como dependiente de la transformación de la vitamina D3 en 25OH Vitamina D3 que se realiza en función del efecto de los rayos UV sobre la piel. Algunos estudios postulan que el aumento de conversión de Vitamina D en 25 OH Vitamina D3 podría tener un efecto sobre la concentración de colesterol. No obstante, no todos los datos apoyan la misma hipótesis, ya que también existen algunos estudios (en modelos animales) que apoyan la posibilidad de que esta vitamina tenga efectos proaterogénicos, quizás en este último caso cuando coexista con elevaciones de la concentración de calcio.

Así pues, la información sobre hábitos alimenticios tiene una especial connotación en las características de este estudio, puesto que servirá para poner de manifiesto no sólo la evolución de los hábitos nutricionales de los españoles sino, sobre todo, para conocer qué elementos de la dieta destacan por sus potenciales características protectoras frente a las enfermedades cardiovasculares. La transformación en micronutrientes, con especial atención a aquellos con capacidad antioxidante, nos servirá de referencia para establecer comparaciones ulteriores en la misma muestra así como cotejar nuestros resultados con otros estudios de la misma naturaleza.

Debido a la variabilidad en la ingestión de micronutrientes, nos interesa sobremanera, disponer, además, de datos biológicos de determinados micronutrientes, que es la manera más fidedigna de conocer las concentraciones de estas sustancias en los individuos. A partir de estos datos y junto a otras variables fácilmente cuantificables, se podrán proponer en el futuro nuevos modelos de evaluación del riesgo cardiovascular para la población española, distintos de los diseños actuales basados en poblaciones con diferentes tasas de mortalidad por enfermedad cardiovascular, como la obtenida a partir de la fórmula clásica de la población de Framingham.

En este momento, se cumplen 10 años desde el corte inicial de la cohorte, que actualmente cubre un rango de edades entre 15 y 70 años de edad. Partimos de los datos de los 5000 individuos del estudio DRECE 1. Asumimos conocer el número de individuos fallecidos en dicha muestra de acuerdo con al convenio en trámite con el INE. La mortalidad por enfermedades cardiovasculares durante la última década es en promedio de 350/100000 al año (Indicadores de Mortalidad en España. Centro Nacional de Epidemiología. Subdirección Gral. de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III) Alrededor de 1000 pacientes vistos en el DRECE I presentaban riesgo cardiovascular elevado (Criterios SEA) en el inicio del seguimiento, asumiendo un riesgo de al menos 1,6 veces más de muerte en aquellos con factores de riesgo cardiovascular, el poder estadístico es mayor al 80% y asumiendo un RR de 2 se acerca al 100% para poder establecer la magnitud de la asociación entre factores de riesgo cardiovascular y muerte. (57)

Por este motivo, hemos diseñado este proyecto que tiene como objetivos (ver más adelante) tanto el análisis de mortalidad en función de los factores de riesgo obtenidos hace más de 10 años, como poder disponer de datos biológicos objetivos relacionados con factores ambientales (dieta y exposición) sobre los que existen evidencias que los relacionan con el desarrollo de enfermedad cardiovascular, además de obtener datos de factores de riesgo emergentes (de alguno de ellos ya disponemos datos parciales del corte limitado realizado en 1997) que puedan sernos útiles en un corte posterior de esta misma población (que pretendemos seguir controlando en el futuro).

5. HIPÓTESIS

1. Aunque el riesgo absoluto de mortalidad cardiovascular en España es inferior al de otros países occidentales, el riesgo relativo, o exceso de riesgo asociado a la existencia de los diversos factores de riesgo mayores es similar al observado en otras poblaciones.
2. El patrón alimentario, perfil de factores de riesgo, y perfil lipídico en España ha empeorado significativamente en los últimos 10 años. Este empeoramiento es significativamente superior en las zonas más industrializadas.
3. Existen datos biológicos (antioxidantes, grado de insolación) que explican parte de la "protección" que existe en España frente al desarrollo de enfermedad cardiovascular.

6. OBJETIVOS

1. Determinar la mortalidad cardiovascular, y por todas las causas, de la población constituyente de la cohorte del estudio DRECE, en los 10 años de seguimiento.
2. Correlacionar la mortalidad cardiovascular total y por enfermedades isquémicas del corazón, con los principales factores de riesgo presentes hace 10 años.
3. Intentar establecer ecuaciones de riesgo que permitan estimar el riesgo a 10 años de la población española portadora de diferentes factores de riesgo cardiovascular.
4. Obtener el patrón alimentario actual y los cambios que han tenido lugar desde 1992.
5. Establecer correlaciones entre los patrones dietéticos, los perfiles lipídicos, la morbi-mortalidad cardiovascular y otros factores de riesgo en la población española, y en cada una de las regiones consideradas.
6. Determinar la evolución del perfil de riesgo cardiovascular. Lo cual implica obtener el perfil lipídico actual y los cambios que han tenido lugar en los últimos 10 años (tras la corrección por el cambio de edad) y determinar la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular.
7. Analizar si los cambios que se han observado son idénticos para todas las zonas de España o existen diferencias entre distintas comunidades.
8. Analizar en comparación con otras poblaciones con distinta prevalencia de enfermedad cardiovascular si existen diferencias en la concentración de oligoelementos, antioxidantes e indicadores de exposición a la luz solar.
9. Realizar el mismo análisis anterior (objetivo 9) dentro de subpoblaciones españolas con diferente grado de mortalidad cardiovascular. Analizar si existe distinto grado de exposición
10. Obtener datos "basales" de oligoelementos, antioxidantes y 25OH VitaminaD3 que puedan permitir analizar su valor predictor dentro de diez años.
11. Obtener datos de variabilidad intraindividual de los factores de riesgo emergentes, y valores basales (incluyendo homocisteína y sus condicionantes) de los mismos para analizar su valor predictor dentro de diez años.

7. METODOLOGÍA

7.1. POBLACIÓN Y MÉTODOS

Diseño Inicial del estudio del estudio (DRECE I)

El estudio DRECE fue diseñado en 1991 como un estudio transversal sobre un universo constituido por la población española de 5 a 59 años de edad, estratificada por edad y sexo, distribuida en ocho regiones geográficas según la división realizada por la Dirección General de Política Alimentaria del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, para sus estudios de consumo alimentario en España.

El tamaño total de la muestra fue estimado en 5.000 individuos en función de asumir una prevalencia de hipercolesterolemia de un 25% (nivel de significación $p < 0,05$, error estimado máximo de $\pm 4.6\%$ para el estrato de menor tamaño, con $n = 362$ individuos). Para cada uno de los seis estratos de edad considerados (5-12, 13-19, 20-29, 30-39, 40-49, y 50-59 años) se decidió estudiar un número idéntico de individuos de ambos sexos. En cada estrato de edad se incluyó un número de participantes proporcional a la distribución real de individuos en la población española. Del mismo modo, se proyectó reclutar en cada una de las regiones en que se distribuyó el territorio español un número de sujetos (igual de varones que de mujeres) acorde con su peso específico en la población española total.

Se optó por un muestreo por conglomerados, eligiéndose de forma aleatoria 54 centros de asistencia primaria como puntos básicos de selección. Cada uno de los centros seleccionó, de forma aleatoria, un tamaño muestral de acuerdo con su zona de cobertura y con el peso específico que representa en el global de la población española. Se utilizaron dos sistemas para seleccionar a la población de forma aleatoria, de manera que si el centro disponía de un censo de usuarios potenciales o cupo (población total, no únicamente población que acude habitualmente al centro) se utilizó dicho censo y en caso de no disponer del mismo se utilizó un sistema de rutas aleatorias. El censo de usuarios fue el método mayoritariamente empleado, un 80% de los centros participantes, y sólo en el 20% de los casos se utilizó un sistema de rutas aleatorias. La cobertura total estimada fue superior al 95% de la población española. La lista de selección incluyó una reserva de un 50% adicional para cada estrato de sexo y edad. La tasa de respuesta inicial obtenida alcanzó el 63% del global de la población seleccionada. En el registro de ausencias (encuesta) se observó que éstas no estaban relacionadas con los objetivos principales del estudio: el 80% de las ausencias se debieron a la negativa a la extracción de sangre (criterio excluyente) y el 20% restante a causas diversas (fallo de localización en el 6,4%, aceptaron participar pero no acuden a la cita en el 7,2%, negativa por causas laborales en el 5,6% y fueron rechazados por enfermedad intercurrente o por enfermedad crónica grave un 0,8%). Con la utilización de la población de reserva se consiguió llegar al 96% de la población inicialmente estimada.

Tras la selección, los participantes fueron debidamente informados de los objetivos y la finalidad del estudio por su médico de atención primaria, antes de otorgar, en presencia de testigos, su consentimiento para participar en el estudio DRECE. El protocolo de recogida de datos tuvo cuatro partes: una encuesta sobre antecedentes personales y familiares (incluyendo consumo de tabaco y fármacos diversos), una encuesta dietética (recuerdo semanal), una exploración física básica (incluyendo peso en ropa interior, talla, presión arterial, frecuencia cardiaca) y una extracción de sangre. En todos los casos, la encuesta, la exploración física y la extracción de sangre fueron realizadas en el centro de salud por el personal sanitario colaborador correspondiente, debidamente adiestrado para la correcta recogida de datos de las encuestas. No obstante, con el objeto de garantizar una recogida de información más homogénea, se redactó un manual de operaciones que contenía todas las instrucciones necesarias para la encuesta y exploración física y se reunió a todo el personal colaborador con el fin de aclarar todos los detalles correspondientes.

Diseño del estudio DRECE II

En el año 1996, se realizó un nuevo corte parcial de la población constituyente de la cohorte DRECE. Para ello, se estimó el nivel de riesgo de cada individuo en función de las normas previamente establecidas por la Sociedad Española de Arteriosclerosis y se seleccionó a todos los individuos que podían considerarse como portadores de algún nivel de riesgo (ligero, moderado o alto) en el corte del DRECE I, y a una subpoblación (2:1) control, emparejada por sexo y estrato de edad con los seleccionados anteriormente, entre los individuos que habían sido considerados como de bajo riesgo. Contando con los mismos centros de salud que habían participado en el primer estudio y con un protocolo similar, únicamente modificado para poder recoger con un nivel suficiente de objetividad de los datos de morbilidad, se contactó con los individuos seleccionados con el fin de analizar su estado de salud y realizar la exploración física, extracción de sangre y encuesta dietética correspondientes. En esta ocasión, la tasa de respuesta del 70 % (1079 individuos, 712 con riesgo y 367 sin riesgo), siendo las principales causas de ausencia las siguientes: 50% (15% de la muestra total seleccionada) por fallo en la localización del individuo (tras diversos intentos) y 20% por negativa del individuo a participar (6% de la muestra total seleccionada). En cualquier caso, las causas de ausencia no fueron significativamente diferentes entre los pacientes con riesgo y sin riesgo. Entre los individuos participantes, se habían producido 12 fallecimientos, 9 de ellos por causa cardiovascular, y 46 accidentes cardiovasculares (26 coronarios, 23 en la población con riesgo y 3 en la población sin riesgo), lo que nos permitió establecer que el riesgo relativo de la población "con riesgo" era de 3,9. (19)

DISEÑO DEL ESTUDIO ACTUAL (DRECE III)

Población participante: el estudio DRECE III (seguimiento a los 10 años) se proyecta sobre la población total participante en el estudio DRECE, que actualmente tendrá entre 15 y 70 años de edad. Los centros de salud participantes serán los mismos que participaron en el estudio inicial, aunque tengamos que sustituir a algunos de los investigadores que ya no se encuentren en los centros de referencia.

RECOGIDA DE LOS DATOS DE MORTALIDAD: Los datos de mortalidad cardiovascular y por todas las causas, será aportada por el INE (en el momento de preparar esta memoria el convenio está aceptado verbalmente y se está redactando el contrato de colaboración con el INE), en base a los certificados de defunción registrados. Este

registro es totalmente informático y depende de los datos recogidos (con su consentimiento) en el estudio DRECE I. Por esta razón estimamos que dispondremos de información válida de prácticamente el 100% de la población incluida.

7.2. RECLUTAMIENTO Y PROCEDIMIENTOS

A todos los integrantes vivos de la cohorte del DRECE se les invitará a participar en el estudio, que consistirá en la misma revisión física, nutricional y analítica realizada en las dos cortes anteriores, en los dos cortes anteriores. Se pondrá especial atención en el registro de la morbilidad a través de cuestionarios específicos y revisión de las historias clínicas correspondientes a sabiendas de que es una información de naturaleza diferente a la que aportará el INE. Se evaluará el grado la validez de la misma.

1.Procedimiento de reclutamiento de los sujetos de estudio

- 1.1 Definición del listado oficial (doc.1): verificación de la exactitud-criterios de inclusión/exclusión
- 1.2 Definición del procedimiento de selección identificación de los estratos (doc.2)
- 1.3 Confección del listado correspondiente en cada centro (doc.3)

En cada centro: localización de los sujetos

Búsqueda: listado previo>Listado del centro de salud> Tarjeta sanitaria (dirección área)> Padrón municipal.

Contacto: Postal (acuse de recibo):1,2.> Telefónico:1,2,3.> Via centro de salud> Via Padrón.

Teniendo en cuenta la experiencia acumulada en los dos cortes anteriores, estimamos que las ausencias NO JUSTIFICADAS no superaran el 10% de la cohorte (además de los individuos que hayan fallecido)

2. Exámen físico, extracción de sangre y cuestionario (6-8 meses). En los 50 centros de Salud participantes.Realización de los analisis sobre las muestras obtenidas, en tiempo real con la llegada de las muestras .

Los cuadernos recogidos durante el trabajo de serán grabados en una base de datos, utilizando las siguientes herramientas que garantizan la validez y auditabilidad de dicha base:

- Formación del personal de entrada de datos
- Diseño de una base de datos mediante un sistema informático validado
- Sistemas de seguridad que restringen el acceso de datos. Filtros.
- Revisión de datos mediante "edit checks" programados
- Control de calidad: Contraste cuadernos completos y sus posibles formularios de clarificación, con la base de datos. Ejecución de todos los "edits checks"

Cumplimiento de todas las medidas de seguridad del real decreto 994/1999 para el cumplimiento de la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal.

7.3. ENCUESTA DE HÁBITOS ALIMENTARIOS

Se realizará mediante la aplicación de un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) desarrollado y validado para la población adulta española (cita 7). La versión del CFCA consta de 71 items agrupados en 11 grupos de alimentos en función de la afinidad en el contenido de nutrientes. Cada grupo de alimentos tiene un tamaño

predeterminado de ración promedio. Se pregunta acerca del consumo de estos grupos de alimentos en el último año, asignándose 5 diferentes frecuencias de consumo (nunca, anual, mensual, semanal y diaria). A partir de estos datos, se estima la cantidad (g/per capita/día) de consumo de los diferentes grupos de alimentos, la adecuación del número de raciones a las recomendaciones actuales y la transformación a energía y macronutrientes, según un programa informático ad hoc basada en las tablas españolas de composición de alimentos (Mataix J et al. Tabla de composición de alimentos españoles (3ª ed) Universidad de Granada, 1998 y Moreiras-Varela O, et al. Tablas de composición de alimentos (2ª ed). Madrid: ediciones Pirámide, 1999).

Para completar el estudio y poder tener una descripción más detallada de la ingestión de nutrientes, en especial de micronutrientes, el CFCA se complementará con un registro alimentario de 7 días. Para ello, se contará con entrevistadores cualificados (becarios) que se encargarán de explicar el método de recogida de la información (con descripción por escrito, incluyendo figuras pormenorizadas de las raciones habituales), así como de revisar cada una de las encuestas dudosas junto a los participantes. La transformación a nutrientes se realizará mediante soporte informático, utilizando las mismas fuentes documentales de composición de alimentos que para el CFCA.

7.4. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

1. Fase Preanalítica.
 - Ø En el centro de asistencia primaria
 - a. Citación del participante para extracción de sangre entre las 8:00 y 10:00 am. Con las siguientes recomendaciones:
 - i. No ingerir nada más que agua desde 12 horas antes.
 - ii. No realizar ningún esfuerzo importante en las 12h previas.
 - iii. No realizar ningún cambio en los hábitos de vida.
 - iv. No fumar.
 - b. Recepción del paciente, por lo menos 15 min. Antes de realizar la extracción. Desde ese momento debe permanecer en reposo.
 - c. Extracción de sangre con el paciente sentado.
 - d. No utilizar manguito o si fuera necesario su uso, retirarlo una vez canalizada la vena en la que va a realizarse la extracción.
 - e. Extracción de sangre venosa con sistema de vacío y los siguientes recipientes:
 - i. 2 Tubos con gel separador y activador de coágulo, con un vacío equivalente a 9 ml, marcados con el número de identificación del participante.
 - ii. 2 Tubos vacíos con tapón especial y vacío equivalente a 6 ml. (Oligoelementos), marcados con el número de identificación del participante.
 - f. Dejar los tubos en reposo y a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 min.
 - g. Transportar los tubos al laboratorio colaborador para proceder a su centrifugación y separación del suero en los recipientes adecuados.
 - h. Colocar los tubos con el suero obtenido en los recipientes diseñados con esta finalidad y que estarán marcados con un código de barras con el número de identificación del paciente.(dos tubos estándar y 2 tubos prelavados con ac. nítrico). Colocar todos los tubos en el envase de transporte (triple envase) diseñado con esta finalidad y que contiene el gel conservador de temperatura.

- i. Rellenar la hoja de ruta con los códigos de identificación de los participantes y sus CRD.
- j. Avisar al servicio de mensajería para la recogida del envío, utilizando el código asignado al centro.

Ø En el Laboratorio Central (FJD-UNILABS)

1. Comprobación de la concordancia entre muestras, hoja de ruta y CRD. Iniciar actuaciones correctoras si fuera necesario.

2. Llenar la hoja de registro con las muestras y CRD recibidos.

3. Preparación de alicuotas de las muestras que deban ser congeladas y congelarlas a -80°C en el clasificador de muestras correspondiente. Tanto las que correspondan a análisis retrasados (2º nivel) como las que correspondan a seroteca.

4. Creación de los archivos de los participantes en el sistema informático del laboratorio. Los únicos datos demográficos que quedarán grabados son:

- Nombre: Solo las iniciales
- Origen: DRECEIII
- Procedencia: Número de centro
- Sexo y edad: las correspondientes al participante
- Número de identificación: el asignado a cada participante
- Pruebas: Las correspondientes al 1er nivel y las de 2º nivel.

(la finalidad de esta introducción es la de permitir la transferencia electrónica, tanto de los resultados inmediatos como de los retrasados y tanto desde los sistemas analíticos al sistema informático, como desde el sistema informático a la base de datos del estudio)

5. Introducción en el sistema de proceso analítico de las muestras que deban ser analizadas en el momento (análisis de 1er nivel).

2. Fase Analítica

➤ Procedimientos de 1er nivel. Los procedimientos de primer nivel son los que se realizan inmediatamente tras la recepción de las muestras. Son los siguientes:

o Perfil Bioquímico Básico (Suero):

- Glucosa, Urea, Creatinina, AST, GTP, Ca, Mg, Proteínas Totales, Albúmina, AcÚrico. Métodos rutinarios habituales (Modular, Roche), idénticos a los utilizados en el DRECEI y DRECEII

o Perfil lipídico Básico (Suero):

- Colesterol, Triglicéridos. Métodos rutinarios habituales (Modular, Roche), idénticos a los utilizados en el DRECEI y DRECEII
- colHDL. Precipitación con Ac. Fosfotungstico-Mg y determinación de colesterol en sobrenadante en un Olympus AU400. Se ha seleccionado este método porque es el mismo que fue utilizado en los cortes del DRECEI y DRECEII
- ApoAI y ApoB. Inmunoturbidimetría. Kits de WAKO, automatizados en un Olympus AU400. Este método corresponde a la estandarización (IFCC) del método utilizado en DRECEI y se corresponde con el utilizado en el DRECEII (ya estandarizado y comprobada su transferabilidad).

- o Perfil lipídico completo. Este perfil se realizaría en participantes con concentración de triglicéridos superior a 200 mg/dl:
 - Separación y determinación de VLDL, LDL y HDL por Ultracentrifugación de rutina. Brevemente: El método actualmente considerado como de referencia es el método combinado ultracentrifugación-precipitación . Este método consiste en una ultracentrifugación del suero sin ajuste de densidad ($d=1.006$ kg/L, usualmente a 105000 g, durante 17 h, en un rotor con una constante k de aproximadamente 100), lo cual permite aislar a la VLDL como lipoproteína sobrenadante. El infranadante de esta ultracentrifugación es sometido a una técnica de precipitación con polianiones, que permite la precipitación de las lipoproteínas con apoB o apoE, y en consecuencia conservar a la HDL (HDL2 y HDL3) en el sobrenadante . La determinación de la concentración de colesterol en el suero completo, la fracción de VLDL, el infranadante de la ultracentrifugación y el sobrenadante de la precipitación (colesterol de HDL), permite estimar la concentración de colesterol de LDL (colesterol infranadante - colesterol de HDL) tras efectuar las correspondientes correcciones por variaciones de volumen, y obtener la concentración de colesterol correspondiente a las principales familias de lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL).
 - Todos estos procedimientos estarán sometidos al control interno característico del laboratorio y a un programa de control de calidad externo multinacional (RIQUAS, RANDOX), que también es el habitual del laboratorio.
- o Factores de riesgo emergentes (Suero).
 - Lipoproteína (a). Inmunoturbidimetría. Kits de Wako. Automatizada en Olympus AU400. Esta determinación ya fue introducida en el corte del DRECEII.
 - HsPCR (PCR de alta sensibilidad). Inmunonefelometría amplificada con latex (DADE-Behring). Este método ya fue utilizado en el corte del DRECE II.
- o Marcadores nutricionales (Suero)
 - Prealbúmina (TBPA) y transferrina. Inmunoturbidimetría automatizada (DADE-Behring)

Procedimientos de 2º nivel .Los procedimientos de 2º nivel son los que se realizan en alícuotas conservados a -80°C . La mayor parte de estas determinaciones son detectores de tipo nutricional, aunque algunos de ellos también detectan exposición a elementos protectores (Selenio) o potencialmente perniciosos. Dentro de estos análisis incluimos:

- o Oligoelementos. Dentro de ellos distinguimos dos grupos:
 - Grupo 1: Cobre, Zinc, Magnesio y Manganeseo.
 - Grupo 2: Selenio, Arsénico y Mercurio

La determinación de Oligoelementos será realizada mediante ICP-AES Axial ("Inductively Coupled Plasma - Atomic Emisión Spectrometry") con un equipo VARIAN

Vista-PRO que dispone de una antorcha de disposición Axial y un chip de detección que cubre longitudes de onda de hasta 160 nm.

Adicionalmente, para la determinación de los elementos del grupo 2, es necesario adquirir un sistema generador de hidruros que permita aumentar significativamente la sensibilidad del sistema en sus líneas de emisión hasta 1 mg/l. La determinación de los elementos mencionados es la que obliga a utilizar tubos de extracción especiales (para evitar contaminación) y tubos de separación prelavados con ac. Nítrico.

o Vitaminas. Dentro de este grupo de determinaciones se incluyen dos grupos, separados fundamentalmente por la metodología a utilizar:

- Ac. Fólico y Vitamina B12. Serán determinadas en suero mediante un método de inmunoquimioluminiscencia en un equipo Immulite 2000 (DPC).
- Vitaminas A yE, y 25-OH-Vitamina D3. Todas estas vitaminas serán determinadas mediante métodos de HPLC, que implican:
 - Extracción del suero
 - HPLC en una RP18
 - Detección UV.

Para estas determinaciones se utilizará un equipo VARIAN, compuesto por inyector automático, bomba isocrática y detector UV-VIS, y utilizando reactivos de Cromosystems.

En el caso de Homocisteina se incluirá un paso de derivatización pre-columna y la detección mediante un detector de fluorescencia. En un número limitado de las muestras se compararán los resultados con los obtenidos mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (Varian-Saturn), Utilizando un Kit especial para la determinación de aminoácidos de Phenomenex.

3. Fase Post-Analítica. Tras la obtención de los datos de laboratorio y su oportuna validación en la base de datos del laboratorio, se procederá a su exportación al sistema informático dedicado y se gestionará la edición de los informes correspondientes que serán remitidos a los equipos de investigación participantes para que se los hagan llegar a los participantes en el estudio. La información remitida a los participantes será aquella que se considera como relevante (aunque en ningún momento se acompañará de recomendaciones específicas) para la gestión de su salud en virtud de parámetros establecidos y reconocidos. Es decir, se comunicarán los resultados del perfil bioquímico y perfil lipídico básicos y toda aquella información adicional que pueda ser utilizada con fines asistenciales (se valorará individualmente cada "paquete" de información, en busca de indicadores que en caso de ser comunicados podrían redundar en un beneficio para el participante en función de la práctica habitual).

8. PLAN DE ANALISIS ESTADÍSTICO

8.1. PODER ESTADÍSTICO

Partimos de los datos de los 5000 individuos del estudio DRECE 1. Asumimos conocer el número de individuos fallecidos en dicha muestra de acuerdo con el convenio en trámite con el INE. La mortalidad por enfermedades cardiovasculares durante la última década es en promedio de 350/100000 al año (Indicadores de Mortalidad en España. Centro Nacional de Epidemiología. Subdirección Gral. de Epidemiología.

Instituto de Salud Carlos III) Alrededor de 1000 pacientes vistos en el DRECE I presentaban riesgo cardiovascular elevado (Criterios SEA) en el inicio del seguimiento, asumiendo un riesgo de al menos 1,6 veces más de muerte en aquellos con factores de riesgo cardiovascular, el poder estadístico es mayor al 80% y asumiendo un RR de 2 se acerca al 100% para poder establecer la magnitud de la asociación entre factores de riesgo cardiovascular y muerte.(25)

8.2. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La información obtenida será informatizada mediante un procedimiento de doble entrada que permitirá una primera depuración por comparación. Posteriormente, se realizará una revisión específica de los valores de cada parámetro. La base de datos formada será analizada con la ayuda del paquete estadístico SAS. La explotación estadística comenzará por un análisis descriptivo . Las variables cualitativas se describirán mediante frecuencias absolutas y relativas, las variables cuantitativas en que se acepte la distribución normal se resumirán mediante media, desviación estándar, mínimo, máximo y número de casos, mientras que las variables claramente no normales se resumirán mediante mediana, y el intervalo intercuartílico, estas variables se transformarán mediante logaritmo neperiano a la hora de ser introducidas en cualquier modelo. El análisis descriptivo se realizará además de manera estratificada por sexo y estratos de edad y se harán comparaciones mediante análisis de la variancia (ANOVA) y test Chi-cuadrado de acuerdo a la naturaleza de la variable. El sesgo de selección para el estudio de incidencia de morbilidad se estudiará comparando los pacientes incluidos y los perdidos.

Procedimientos:

1. La mortalidad recogida a través del INE se codificará por diferentes criterios y se realizará un estudio de incidencia (incidencia acumulada y tasa de incidencia anual).
2. Se realizará un primer estudio de asociación bivalente entre los factores de riesgo (basales) contemplados en las ecuaciones tradicionales para constatar que se tratan de factores de riesgo en nuestra muestra. Los datos se categorizarán y estratificarán atendiendo a la naturaleza de cada variable. Se utilizará la regresión de Poisson para obtener el riesgo relativo de cada factor siendo las tasas de incidencia las variables respuesta.
3. Elaboración de ecuaciones (una para cada variable objetivo detallada en el apartado 3) adaptada a las características de nuestra muestra: estimación de nuevos coeficientes para los factores de riesgo (a priori se supone que serán los mismos que en las ecuaciones anteriores) y cálculo de las puntuaciones o probabilidades dadas por estas nuevas ecuaciones. Se estudiarán varios modelos de tiempo hasta el evento con casos censurados que asuman riesgo proporcional (Cox y Weibull) y que no asuman riesgo proporcional (23).
4. Utilización de las ecuaciones de Framingham. Se utilizarán para observar el comportamiento de nuestros datos. La escala de comparación central será la de mortalidad cardiovascular de Framingham y se hará una aproximación - - según la validez de la información sobre morbilidad (infarto de miocardio no mortal y angor pectoris) - - al estudio descriptivo de las puntuaciones tradicionales de Framingham : se obtendrán las puntuaciones basales (probabilidades) correspondientes a las ecuaciones tradicionales y sus variantes (enfermedad cardiovascular, enfermedad coronaria y muerte por ambos motivos, ACV e infarto de miocardio, enfermedad coronaria, (21, 22). actualizada con TG y actualizada con HDL (24)) y se describirán en global y según los subgrupos de interés.

5. Estudio de la concordancia entre las probabilidades dadas por cada ecuación, estimando varios índices de equivalencia entre las tres ecuaciones: coeficiente de correlación intra clase, método de las diferencias de medias y se valorará la capacidad predictiva de cada uno mediante el área bajo la curva con su correspondiente comparación. Se realizará también un análisis de concordancia en el establecimiento de casos utilizando para ello los puntos de corte establecidos. Se utilizará el test de Mc Newman y el índice Kappa.

6. Es estudio de la evolución del perfil lipídico y de la dieta no utilizarán el emparejamiento sino que se analizarán como cortes independientes estandarizando (ponderando) los valores finales, usando la distribución basal de sexo y edad como población de referencia para el ajuste. Además los nutrientes serán ajustados por la energía total consumida mediante análisis de regresión (58). Además sobre el colesterol en sangre se realizará un estudio detallado donde se compara la variación de este valor de la analítica con las predicciones de las ecuaciones de Keys y Hegsted de la variación a partir del cambio alimenticio y con la variación prevista por el transcurso del tiempo.

7. Los nuevos parámetros recogidos en el estudio transversal no serán utilizados en este momento para la estimación ni incorporación en ninguna ecuación predictiva. Únicamente serán utilizados para un estudio descriptivo y comparativo entre diferentes regiones dentro de España y para su comparación con los obtenidos en otras poblaciones con diferente mortalidad cardiovascular y reservados para análisis predictivos posteriores.

9. REFERENCIAS

1. Dawber TR. *The Framingham study. The epidemiology of atherosclerotic disease.* Cambridge. Harvard University Press,1980.
2. Instituto Nacional de Estadística. *Defunciones según la causa de muerte,1992. Tomo I, resultados básicos.* Madrid. Instituto Nacional de Estadística, 1995.
3. Ministerio de Sanidad y Consumo. *Dirercción general de Planificación Sanitaria..Consenso para el control de la colesterolemia en España.*Madrid 1989.
4. Villar Alvarez F, Banegas Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Del Rey Calero J. *Mortalidad cardiovascular en España y sus comunidades autónomas (1975-1992).*Med Clin (barc) 1998;110:321-327.
5. Ministerio de Sanidad y Consumo. *Estudio DRECE. Dieta y Riesgo Cardiovascular en España.* Madrid. 1993.
6. *Recomendaciones para la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular. Sociedad Española de Arteriosclerosis,Sociedad Española de Medicina Interna y Liga de la Lucha contra la Hipertensión. Clínica e Investigación en Arteriosclerosis. 1994. Vol. 6. Nº 2:62-102.*
7. Martín-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maissonneuve P, Fernández JC,Salvini S, Willet WC. *Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain.* Int J Epidemiol 1993; 22: 512-519.
8. Instituto Nacional de Estadística. *Movimiento Natural de la Población Española 1991.Tomo I.* Madrid.Istituto Nacional de Estadística. 1995.
9. Banegas JR, Villar F, Pérez de Andrés O, Jiménez R, Gil E, Muñiz J, Juane R. *Estudio epidemiológico de los factores de riesgo cardiovascular de la población española de 35 a 64 años.* Rev San Hig Pub 1993; 67:419-455.
10. Plaza Pérez I, y Grupo de Expertos de las Sociedades Españolas de Arteriosclerosis, Cardiología, Pediatría, Nutrición y Medicina Preventiva *Informe sobre el colesterol en niños y adolescentes españoles.* Clin Invest Arteriosclerosis 1991; 3: 47-66.
11. López Martínez MD, Gil A, Porres A, Blazquez E, Montoya Y, Vivanco F, Alvarez Sala L, Gómez Gerique JA y De Oya M. *Perfil lipoproteico en niños y adolescentes de la Comunidad Autónoma de Madrid.* Med Clin (Barc) 1996;107:366-370.
12. *Consejería de Sanidad y Asuntos Sociales de la Región de Murcia. Factores de riesgo cardiovasculares de la región de Murcia,1992.* Murcia: Consejería de Sanidad y asuntos Sociales,1995.
13. Tomás-Abadal L, Varas-Lorenzo C, Bernades-Bernat E, Balaguer-Vintró I. *Coronary risk factors and a 20 year incidence of coronary heart disease and mortality in a Mediterranean industrial population. The Manresa study, Spain.* European Heart Journal 1994;15:1028-1036.

14. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertiglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol.* 1998;81(4a):7B-12B.
15. Jeppensen J, Ole Hein H, Suadicani P Gyntelberg F. Triglyceride concentration and ischemic heart disease. An eight-year follow up in the copenhagen male study. *Circulation* 1998;97:1029-1036.
16. Gould AL et al. Cholesterol reduction yields clinical benefit. A new look at old data. *Circulation* 1995; 91:2274-2282.
17. Gomez-Gerique JA, Gutierrez-Fuentes JA, Montoya MT, Porres A, Rueda A, Avellaneda A, Rubio MA. Lipid profile of the Spanish population: the DRECE (diet and risk of cardiovascular disease in Spain) study. DRECE study group. *Med Clin (Barc)* 1999 Dec 4;113(19):730-5.
18. Ballesteros-Pomar MD, Rubio-Herrera MA, Gutierrez-Fuentes JA, Gomez-Gerique JA, Gomez-De-La-Camara A, Pascual O, Garate I, Montero R, Campina S. Dietary habits and cardiovascular risk in the spanish population: the DRECE study. *Ann Nutr Metab.* 2000;44(3):108-14.
19. Gutierrez Fuentes JA, Gomez-Jerique J, Gomez De La Camara A, Angel Rubio M, Garcia Hernandez A, Aristegui I; Diet and Cardiovascular Risk in Spain Study (DRECE II). Diet and cardiovascular risk in Spain. Description of the evolution of cardiovascular prolile. *Med Clin (Barc)* 2000 Dec 2;115(19):726-9
20. Ballesteros-Pomar, M.D.; Rubio-Herrera, M.A.; Gutiérrez-Fuentes, J.A.; Gómez-Gerique, J.A. et al. p. Dietary Habits and Cardiovascular Risk in the Spanish Population: The DRECE Study (II) Micronutrient Intake. *Ann Nutr Metab.* 2000;44(4):177-182.
21. Anderson KM, Odell PM, Wilson PW, Kannel WB. Cardiovascular disease risk profiles. *Am Heart J* 1991 Jan;121(1 Pt 2):293-8.
22. Anderson KM, Wilson PW, Odell PM, Kannel WB. An updated coronary risk profile. A statement for health professionals. *Circulation* 1991 Jan;83(1):356-62.
23. Anderson KM. A nonproportional hazards Weibull accelerated failure time regression model. *Biometrics* 1991 Mar;47(1):281-8
24. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction od coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837-1847
25. Burr M, Gilbert J, Holliday R, Elwood P, Fehily A, Rogers S, et al. Effects of changes in fat, fish and fibre intakes on death and myicardial reinfarction:diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 1989;ii:757-61.
26. De Lorgeril M, Salen P, Monjaud I, Delaye J. The "diet-heart" hypothesis in secondary prevention of coronary heart disease. *Eur Heart J* 1997;18:13-18.
27. Yarnell JWG, Evans AE. The mediterranean diet revisited-towards resolving the (French) paradox. *Q J Med* 2000; 93:783-785.

28. Simopoulos AP. *The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence.* *J Nutr* 2001 Nov;131(11 Suppl):3065S-73S.
29. Evans P, Halliwell B. *Micronutrients: oxidant/antioxidant status.* *Br J Nutr* 2001;85 Suppl 2:S67-74.
30. Broekmans WMR, Klopping-Ketelaars IAA, Schuurman CRWC, et al. *Fruits and vegetables increase plasma carotenoids and vitamins and decrease homocysteine in humans.* *J Nutr* 2000;130:1578 -1583
31. Hughes K, Ong CN. *Vitamins, selenium, iron, and coronary heart disease risk in Indians, Malays, and Chinese in Singapore.* *J Epidemiol Community Health* 1998 ;52(3):181-5
32. Yue H, Lee JD, Shimizu H, Uzui H, Mitsuke Y, Ueda T. *Effects of magnesium on the production of extracellular matrix metalloproteinases in cultured rat vascular smooth muscle cells.* *Atherosclerosis* 2003 Feb;166(2):271-7.
33. Sauvant MP, Pepin D. *Drinking water and cardiovascular disease.* *Food Chem Toxicol* 2002;40(10):1311-25.
34. Barbagallo M, Dominguez LJ, Resnick LM. *Insulin-mimetic action of vanadate: role of intracellular magnesium.* *Hypertension* 2001;38(3 Pt 2):701-4
35. Ravn HB, Korsholm TL, Falk E. *Oral magnesium supplementation induces favorable antiatherogenic changes in ApoE-deficient mice.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 May;21(5):858-62
36. Sato M, Yanagisawa H, Nojima Y, Tamura J, Wada O. *Zn deficiency aggravates hypertension in spontaneously hypertensive rats: possible role of Cu/Zn-superoxide dismutase.* *Clin Exp Hypertens* 2002 Jul;24(5):355-70.
37. Neggers YH, Bindon JR, Dressler WW. *The relationship between zinc and copper status and lipid levels in African-Americans.* *Biol Trace Elem Res* 2001 Jan;79(1):1-13.
38. Hamilton IM, Gilmore WS, Strain JJ. *Marginal copper deficiency and atherosclerosis.* *Biol Trace Elem Res* 2000 ;78(1-3):179-89.
39. Alissa EM, Bahijri SM, Ferns GA. *The controversy surrounding selenium and cardiovascular disease: a review of the evidence.* *Med Sci Monit* 2003 Jan;9(1):RA9-RA18
40. Hughes K, Chua LH, Ong CN. *Serum selenium in the general population of Singapore, 1993 to 1995.* *Ann Acad Med Singapore* 1998 ;27(4):520-3.
41. Navarro-Alarcon M, Lopez-Garcia de la Serrana H, Perez-Valero V, Lopez-Martinez C. *Serum and urine selenium concentrations in patients with cardiovascular diseases and relationship to other nutritional indexes.* *Ann Nutr Metab* 1999;43(1):30-6.

42. Miyazaki Y, Koyama H, Nojiri M, Suzuki S. Relationship of dietary intake of fish and non-fish selenium to serum lipids in Japanese rural coastal community. *J Trace Elem Med Biol* 2002;16(2):83-90
43. Morrison HI, Semenciw RM, Mao Y, Wigle DT. Serum iron and risk of fatal acute myocardial infarction. *Epidemiology* 1994;5;243.246.
44. Ascherio A, Willet WC. Are body iron stores related to the risk of coronary heart disease?. *N Eng J Med* 1994;330:1152-1154.
45. Bartfay WJ, Bartfay E. Decreasing effects of iron toxicosis on selenium and glutathione peroxidase activity. *West J Nurs Res* 2002 Mar;24(2):119-31.
46. Salonen JT, Seppanen K, Nyyssonen K, et al. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation* 1995 ;91(3):645-55
47. Guallar E, Sanz-Gallardo I, van 't Veer P, et al. Mercury, Fish oils, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2002;347:1747-54.
48. Yoshizawa K, Rimm E, Morris JS et al. Mercury and the risk of coronary heart disease in men *N Engl J Med* 2002;347:1755-60.
49. Appel LJ, Miller III ER, Jee SH, et al. Effect of dietary patterns on serum homocysteine. Results of a randomized, controlled feeding study. *Circulation* 2000;102:852-857.
50. Hung JH, Beilby JP, Knuiman MW, et al. Folate and vitamin B-12 and risk of fatal cardiovascular disease: cohort study from Busselton, Western Australia. *BMJ* 2003;326:131-136.
51. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002; 325:1202-1208.
52. Pell JP, Cobbe SM. Seasonal variations in coronary heart disease. *Q J Med* 1999;92:689-696.
53. Scragg R. Seasonal variations of mortality in Queensland. *Community Health Study* 1982;6:120-9.
54. Grimes D, Hindle E, Dyer T. Sunlight, cholesterol and coronary heart disease. *Q J Med* 1996;89:579-589
55. Vick T, Try K, Thelle DS, Forde OH. Tromso heart study: vitamin D metabolism and myocardial infarction *Br Med J* 1979; 2:176.
56. Lund B, Badskjaer J, Lund B, Sorensen OH. Vitamin D and ischaemic heart disease. *Horm Metab Res* 1978;10:553-6.
57. Schoenfeld DA, Richter JR: Nomograms for calculating the number of patients needed for a clinical trial with survival as an endpoint. *Biométries* 1982;38:163-170.

58. Willett WC, Howe GR, Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 1997 Apr;65(4 Suppl):1220S-1228S; discussion 1229S-1231S